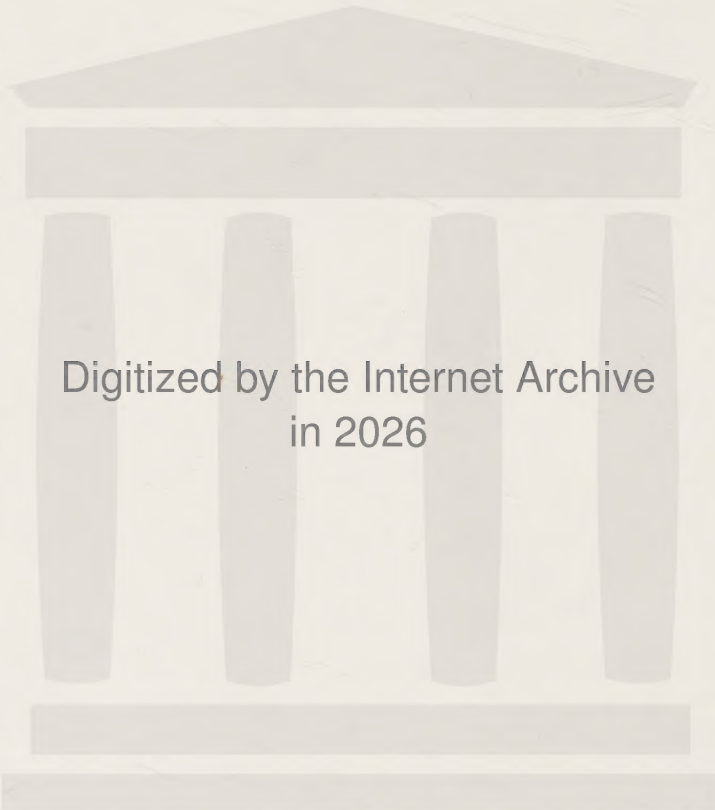


IN VITRO UNTERSUCHUNGEN ÜBER OCYTOCIN
IN STEROIDPRODUZIERENDEN GEWEBEN
BEIM RIND

von

Robert Alois Koll

*Diss
München
1905*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554826_0060

Aus dem Institut für Physiologie
der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft Weihenstephan
der Technischen Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. Heinrich Karg

vorgelegt über das Institut für Physiologie
Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians Universität München

IN VITRO UNTERSUCHUNGEN ÜBER OCYTOCIN
IN STEROIDPRODUZIERENDEN GEWEBEN
BEIM RIND

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians Universität München

von

R o b e r t A l o i s K o l l

aus Prienbach/Inn

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. U. Lösch

Koreferent: Priv.-Doz. Dr.Dr.habil. Ch. Ring

Tag der Promotion: 22. Februar 1985

Meinen Eltern
und Geschwistern

IN VITRO UNTERSUCHUNGEN ÜBER OCYTOCIN IN STEROID- PRODUZIERENDEN GEWEBEN BEIM RIND

	EINLEITUNG	7
I	LITERATUR	8
1.1	Vorbemerkung, Historisches	8
1.2	Zyklusverkürzende Wirkung von Ocytocin	9
1.3	Zyklusverlängerung durch Ocytocinblockade	10
1.4	Radioimmuntest für Ocytocin	10
1.5	Untersuchungen über ovariellcs Ocytocin beim Schaf	11
1.5.1	Zyklusabhängige Freisetzung von Ocytocin	11
1.5.2	Arterio-venöse Differenz der Ocytocin- konzentration in verschiedenen Blutgefäßen	12
1.5.3	Ocytocinkonzentration und Beziehung zur Gelbkörperanzahl	12
1.5.4	Ocytocin in Corpus luteum Gewebeextrakten	13
1.5.5	In vitro Ocytocinproduktion durch große Lutealzellen	13
1.6	Untersuchungen über ovariellcs Ocytocin beim Rind	14
1.6.1	Ocytocinkonzentrationen in verschiedenen Blutgefäßen	15
1.6.2	Ocytocin und Beziehung zur Gelbkörper- anzahl	15
1.6.3	Ocytocin in Corpus luteum Gewebeextrakten	16
1.6.4	Parallelität in der Freisetzung von Ocytocin und Neurophysin	16

2	Inkubationsversuche mit Ovargewebe	17
2.1	Inkubation von Corpus luteum Gewebestücken	17
2.2	Inkubationsversuche mit Corpus luteum Zellen	18
2.2.1	Inkubationsversuche mit ovinen Corpus luteum Zellen	19
2.2.2	Inkubationsversuche mit bovinen Corpus luteum Zellen	20
2.3	Inkubationsversuche mit Follikeln	23
2.3.1	Inkubationsversuche mit bovinen Follikeln	23
2.3.2	Inkubationsversuche mit ovinen Follikeln	25
3	Ocytocin in steroidproduzierenden Geweben von Mensch und Ratte	26
II	MATERIAL UND METHODEN	28
1	Gewinnen der Proben	28
1.1	Gewinnen der Proben für die Gewebeextraktion	28
1.2	Gewinnen der Proben für die Inkubationsversuche	29
1.3	Gewinnen der Follikelflüssigkeit	30
2	Extraktion aus Gewebe	30
3	Inkubation von Gewebestücken und Zellen	32
3.1	Inkubation von Follikeln	33
3.1.1	Inkubation ganzer Follikel	33
3.1.2	Inkubation von Granulosa- und Thekazellen	33

3.2	Inkubation von Corpus luteum Gewebestücken	35
3.3	Herstellen und Inkubation von Corpus luteum Zellsuspensionen	35
3.4	Versuchsaufbau der Inkubationsversuche mit Corpus luteum Gewebestücken bzw. Zellen	37
4	Hormonanalysen	38
4.1	Radioimmuntest	38
4.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	40
5	Proteinbestimmung	41
6	Zusammenstellung der wichtigsten Geräte und Reagenzien	42

III	ERGEBNISSE	46
1	Ergebnisse der Gewebeextraktionen	46
1.1	Ocytocingehalt in Äthanolextrakten aus Hoden und akzessorischen Geschlechtsdrüsen beim Bullen	46
1.2	Ocytocingehalt in Äthanolextrakten aus Nebennieren des Rindes	47
1.3	Ocytocingehalt in Äthanolextrakten boviner Corpora lutea verschiedener Zyklusstadien	49
2	Ocytocingehalt in der Follikelflüssigkeit nicht atretischer Follikel verschiedener Größen, sowie in Zysten beim Rind	50
3	Hormonfreisetzung von inkubierten bovinen Follikeln in das Kulturmedium	51
4	Ergebnisse der Inkubationsversuche mit Corpus luteum Gewebestücken	57
4.1	Einfluß der Inkubationsdauer	57
4.2	Einfluß des Alters (Zyklusstand) des Corpus luteum	59
4.3	Einfluß von FSH (NIH-S6)	61
4.4	Einfluß von Östradiol-17 β	63

4.5	Einfluß von Indomethazin, Prostaglandinen sowie dem PGF_2 -Analog Cloprostenol ^R (Versuch 1 - 4)	65
4.6	Schlußfolgerung aus den Ergebnissen 4.1 - 4.5	72
5	Ergebnisse der Inkubationsversuche mit Corpus luteum Zellen	74
5.1	Einfluß der Inkubationszeit und Zusatz von hCG	74
5.2	Einfluß von Steroidhormonen und Gonadotropinen sowie von Ocytocin	78
5.2.1	Einfluß von Progesteron	78
5.2.2	Einfluß von Östradiol-17 β	79
5.2.3	Einfluß von LH (NIH-B8)	80
5.2.4	Einfluß von FSH (NIH-S6)	81
5.2.5	Einfluß von Ocytocin	82
5.3	Einfluß von Prostaglandinen	84
5.3.1	Einfluß von $\text{PGF}_{2\alpha}$	86
5.3.2	Einfluß von PGI_2	87
5.3.3	Einfluß von PGE_2	89
5.4	Schlußfolgerung aus den Ergebnissen 5.1 - 5.3	89
6	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) einiger stichprobenartig ausgewählter Proben aus den durchge- führten Versuchen	93

IV	DISKUSSION	97
1	Ergebnisse der Gewebeextraktionsversuche und der Versuche mit bovinen Follikeln	97
2	Ergebnisse der Untersuchung boviner Follikel	101
3	Inkubationsversuche mit Corpora lutea	103
V	ZUSAMMENFASSUNG	113
VI	SUMMARY	117
VII	LITERATURVERZEICHNIS	120
	Lebenslauf	141

EINLEITUNG

Gut bekannt und hinreichend bewiesen ist, daß Ocytocin im hypothalamisch-neurohypophysären Bereich synthetisiert, gespeichert und abgegeben wird. Die Wirkung bei Geburt und Laktation ist weitgehend geklärt. Inwieweit Ocytocin auch in anderen Bereichen des Fortpflanzungsgeschehens eine Rolle spielt, ist nach wie vor eine Frage, die erst der Klärung bedarf. Viele Autoren halten das Ocytocin für einen wesentlichen Faktor im System der Luteolyse, zumindest was den Wiederkäuer betrifft. So vertritt McCracken (1984) die These, daß Ocytocin beim Schaf die Bildung von luteolytischem $\text{PGF}_{2\alpha}$ im Endometrium stimuliert und so indirekt die Luteolyse bewirkt. Das diesen Effekt hervorrufende Ocytocin soll aus dem Zentralen Nervensystem und eventuell teilweise aus dem Ovar kommen.

Obwohl es schon vor längerer Zeit Hinweise dafür gab, konnte erst in jüngerer Zeit tatsächlich nachgewiesen werden, daß auch in den Gonaden, sowie in anderen am Fortpflanzungsgeschehen beteiligten Geweben, bei einigen Säugetieren relativ große Mengen an Ocytocin, oder zumindest ein dem Ocytocin in jeder Hinsicht sehr nahe verwandtes Peptid enthalten sind.

Zu Beginn vorliegender Untersuchungen war aber noch nicht geklärt ob diese Gewebe auch in der Lage sind, dieses Hormon selbst zu synthetisieren.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich erstens mit der Frage nach dem Ocytocingehalt verschiedener, am Fortpflanzungsgeschehen direkt oder indirekt beteiligter Organe beim Rind. Zum zweiten mit der Frage, ob es im Ovar, speziell im Corpus luteum, eine Synthese von Ocytocin gibt, sowie der möglichen Beeinflussung der Ocytocinabgabe aus diesem Gewebe im in vitro System.

I LITERATUR

1.1 Vorbemerkung, Historisches

Diese Einführung soll eine Zusammenstellung der wichtigsten Hinweise auf das Vorhandensein ovariellen Ocytocins* beim Wiederkäuer sein. Untersuchungen über ovariellcs Ocytocin beim Menschen (WATHES et al. 1982, KHAN-DAWOOD, et al. 1983), das vermutlich ebenfalls aus dem Corpus luteum stammt, sowie Untersuchungen bei Labortieren und anderen Spezies bleiben weitgehend unberücksichtigt. Lange Zeit hat man sich alleine auf den Hypothalamus als Produzent von Ocytocin und verwandter Proteohormone (Vasopressin, etc.) konzentriert. Seit den Untersuchungen von OTT & SCOTT (1910 a) allerdings ist bekannt, daß auch in anderen Geweben Stoffe mit ocytocischer Wirkung enthalten sind. OTT & Scott zeigten, daß Extrakte von Infundibulum, Corpus luteum, Epiphyse und Thymus ein ocytocisches Wirkungsprinzip enthalten. Das Ovar ohne den Gelbkörper hatte diesen Effekt nicht (OTT & SCOTT, 1910 b). Leider fehlt in diesen Berichten der Hinweis auf die Tierart, von der die untersuchten Gewebe stammen. Bestätigung fanden diese Ergebnisse durch die Arbeiten von SCHÄFER & MACKENZIE (1911) sowie MACKENZIE (1911). Sie wiesen die Auslösung des Milchejektionsreflexes bei der narkotisierten Katze durch Extrakt aus dem Schaf Corpus luteum nach.

* Der Schreibweise "OCYTOCIN" wurde unter den derzeit gültigen Alternativen aus etymologischen Gründen der Vorrang gegeben. Der Name Ocytocin leitet sich aus den griechischen Worten $\delta\chi\upsilon\varsigma$ (=schnell) und $\tau\acute{o}\chi\epsilon\iota\nu$ (=gebären) ab. Es ist dies die von der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1975) vorgeschlagene und auch von KARLSON (1980) verwendete Schreibweise.

Mit ähnlichen Versuchen bei der Frau (SCHÄFER, 1913) und beim Rind (GAVIN, 1913) konnte kein Einschießen der Milch hervorgerufen werden. Aus diesem Grunde und da damals die gestagene Wirkung des Gelbkörpers in den Mittelpunkt des Interesses rückte, wurden die Arbeiten in dieser Richtung nicht weiter fortgesetzt.

1.2 Zyklusverkürzende Wirkung von Ocytocin

Die Tatsache, daß Ocytocin im Zyklus des Rindes eine Rolle spielt, wurde erstmals im Jahre 1959 durch ARMSTRONG & HANSEL belegt. Sie stellten fest, daß mit Ocytocininjektionen der Zyklus von Färsen auf 8-12 Tage verkürzt werden konnte. Dieser Effekt tritt allerdings nur auf, wenn Ocytocin vom dritten bis zum sechsten Tag injiziert wird. An anderen Zyklustagen konnten sie diesen Effekt nicht provozieren.

Ähnliche Versuche mit Rindern, aber auch mit Schafen und Ziegen wurden in der Folgezeit von mehreren Autoren durchgeführt. Eine Zusammenstellung findet sich bei BULLERMANN (1984).

Versuche auch bei anderen Tierarten Luteolyse durch Ocytocininjektion zu erreichen, waren bisher nicht erfolgreich (Stute: NEELY et al. 1979, Schwein: DUNCAN et al. 1961, RIGOR & CLEMENTE, 1964, Meerschweinchen: DONOVAN, 1961, Ratte: BRINKLEY & NALBANDOV, 1963).

1.3 Zyklusverlängerung durch Ocytocin-Blockade

Bei Schafen konnte auch der umgekehrte Effekt dargestellt werden. So haben SHELDRICK et al. (1980) durch aktive Immunisierung gegen Ocytocin bei ca. einem Drittel der behandelten Tiere Zyklusverlängerungen von durchschnittlich drei bis sieben Tagen gefunden. Ebenfalls mit aktiver Immunisierung konnten SCHAMS et al. (1983) bei vier von fünf Schafen Zyklusverlängerungen auf bis zu 64 Tage nachweisen. Es ist bemerkenswert, daß in den beiden angeführten Versuchen Ocytocin-Antikörper-Titer mit der Zykluslänge korrelierten.

Durch Verabreichung von Ocytocin-Antiserum vom 3. bis einschließlich 16. Tag, also durch passive Immunisierung konnten SCHAMS et al. (1983) die Zyklen bei vier von acht Tieren verlängern.

Versuche auch beim Rind, analog zum Schaf durch passive Immunisierung Zyklusverlängerung zu erreichen (SCHAMS et al. in Druck) führten zu keiner signifikanten Veränderung. Die folgende Erklärung dürfte zutreffend sein. Während es beim Schaf möglich war, den Ocytocinspiegel durch Antikörperbehandlung auf unter 10% des Ausgangswertes zu reduzieren, konnte beim Rind die Ocytocinkonzentration nur um etwa ein Drittel vermindert werden.

1.4 Radioimmuntest für Ocytocin

Eine neue Entwicklung in der Ocytocinforschung leitete die Etablierung des Radioimmuntests (RIA) für Ocytocin ein. Die bis zu diesem Zeitpunkt gebräuchliche Meßmethode war das biologische Nachweisverfahren, behaftet mit den Nachteilen des hohen methodischen Aufwandes, geringer Probenkapazität, mangelnder Reproduzierbarkeit und zum Teil geringer Spezifität (GOREWIT, 1979).

Durch die Anwendung des RIA ist es möglich, große Probenzahlen mit vertretbarem Aufwand, guter Genauigkeit und Reproduzierbarkeit zu untersuchen.

Ein RIA für die Analyse von Oxytocin im Blut des Rindes wurde zuerst von SCHAMS et al. (1979) entwickelt. Dieses Verfahren wurde mittlerweile so verbessert, daß es möglich ist, Konzentrationen im Subpikogrammbereich zu erfassen (SCHAMS, 1983). Erst dadurch kann man den Oxytocinverlauf während des gesamten Zyklus verfolgen.

Eine Besprechung der wichtigsten biologischen und radioimmunologischen Nachweisverfahren für Oxytocin findet sich bei BAUMANN (1980).

1.5 Untersuchungen über ovarielles Oxytocin beim Schaf

1.5.1 Zyklusabhängige Freisetzung von Oxytocin

Den ersten Nachweis einer zyklusabhängigen Freisetzung von Oxytocin erbrachten SCHAMS et al. (1981), SHELDRIK & FLINT (1981), und WEBB et al. (1981). Nach Ovariectomie bei Schafen, die sich im Zyklus befinden, fällt der Spiegel des zirkulierenden Oxytocins auf niedrige Basalkonzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze im RIA ab (SCHAMS, 1982). Die Oxytocinkonzentrationen im Zyklus sind am niedrigsten während der Brunst, steigen dann zu Beginn der Gelbkörperphase an, erreichen Maximalwerte in der mittleren Lutealphase und fallen dann wieder ab (SCHAMS et al. 1981; SHELDRIK & FLINT, 1981, WEBB et al. 1981). Der Verlauf entspricht damit in etwa der Kurve des Progesteronprofils mit der Abweichung, daß der Oxytocinabfall vor dem Progesteronabfall auftritt. Dies weist darauf hin, daß Produktion und oder Abgabe der beiden Hormone nicht genau parallel verlaufen (SCHAMS et al. 1983).

Während der Trächtigkeit fällt der Ocytocinspiegel beim Schaf etwa ab dem fünfzehnten Tag auf Basalwerte ab und verbleibt auf diesem Niveau über den gesamten Zeitraum der Gravidität (WEBB et al. 1981, SHELDRIK & FLINT, 1981, 1983, SCHAMS & LAHLOU-KASSI, 1984).

1.5.2 Arterio-venöse Differenz der Ocytocinkonzentration in verschiedenen Blutgefäßen

Weitere Beweise für ovariellcs Ocytocin beim Schaf lieferten Versuche, in denen Unterschiede der Konzentrationen in verschiedenen Blutgefäßen nachgewiesen wurden. FLINT & SHELDRIK (1982) konnten während der Lutealphase Unterschiede in den Ocytocinkonzentrationen zwischen Vene und Arterie nur bei den Ovar-, nicht bei den Kopfgefäßen feststellen. Behandelt man Schafe mit dem Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Analog Cloprostenol, kommt es zu einem raschen Ocytocinanstieg in der Vena ovarica, nicht aber in der Vena jugularis (FLINT & SHELDRIK, 1982, 1983).

1.5.3 Ocytocinkonzentration und Beziehung zur Gelbkörperanzahl

Bei vergleichenden Untersuchungen zweier marrokanischer Schafrassen (SCHAMS et al. 1983, LAHLOU-KASSI et al. 1984) ergaben sich für Tiere der Rasse Timhadite, welche eine niedrige Ovulationsrate aufweisen und in der Regel nur einen Gelbkörper besitzen, Ocytocinwerte zwischen 13 und 31 pg/ml Plasma. Tiere der Rasse D'Man, die auf Grund einer hohen Ovulationsrate meist mehrere Corpora lutea ausbilden (im Durchschnitt 2.9), erreichten hingegen Ocytocinwerte zwischen 30 und 60 pg/ml Plasma. Die Korrelation zwischen der Höhe des Ocytocinspiegels und der Anzahl der vorhandenen Gelbkörper ist ein weiterer Hinweis auf den ovariellen insbesondere aber lutealen Ursprung dieses Hormons.

1.5.4 Ocytocin in Corpus luteum Gewebeextrakten

Das Corpus luteum des Schafes enthält große Mengen an Ocytocin. WATHES & SWANN (1982) und WATHES et al. (1983 b) fanden einen Faktor im ovinen Gelbkörper, der sowohl in seinen biologischen, als auch immunologischen Eigenschaften nicht von Ocytocin zu unterscheiden ist. Elution über eine Sephadex-G 50 Säule und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ergaben einen übereinstimmenden Gipfel mit einem Ocytocin-Standard Präparat. FLINT & SHELDRIK (1983) fanden ebenfalls immunreaktives Ocytocin im Gelbkörper des Schafes.

Nach Cloprostenol-Behandlung kommt es im Corpus luteum zu einem Abfall der Ocytocinkonzentration (FLINT & SHELDRIK, 1982, 1983). Der Ocytocingehalt des ovinen Corpus luteum sinkt zu Beginn der Gravidität und spiegelt damit die Konzentrationen im Blut wieder. WATKINS (1983) konnte im Gelbkörper des Schafes in den großen Luteinzellen immunhistochemisch Ocytocin und das zugehörige Neurophysin nachweisen.

1.5.5 In vitro Ocytocinproduktion durch große Luteinzellen

RODGERS et al. (1983 a, b) fanden Hinweise, daß die großen Lutealzellen der Ort der Ocytocinproduktion im Corpus luteum des Schafes sind. Nach Auftrennen der Gelbkörperzellen in Endothelialzellen, kleine Lutealzellen und große Lutealzellen fanden sie nur in den letzteren größere Mengen an Ocytocin. Ein Inkubationsversuch mit diesen drei Zellpopulationen zeigte, daß große Lutealzellen in der Lage sind, Ocytocin in vitro zu synthetisieren. In Fraktionen kleiner Lutealzellen wurde durch die Inkubation keine Veränderung des Ocytocingehaltes hervorgerufen.

1.6 Untersuchungen über ovarielles Ocytocin beim Rind

Abb. 1 Ocytocinverlauf im Zyklus beim Rind



Die Ocytocinkonzentrationen im peripheren Blut beim Rind (siehe Abb. 1) während des Zyklus entsprechen in ihrem Verlauf den Verhältnissen, wie sie beim Schaf anzutreffen sind. Lediglich das Niveau liegt beim Rind wesentlich niedriger als beim Schaf. Auch hier sind die Werte zum Zeitpunkt der Brunst am niedrigsten, um dann mit Beginn der Gelbkörperphase anzusteigen, in der Mitte des Zyklus ein Plateau zu erreichen und gegen Ende des Zyklus wieder abzufallen. Im Gegensatz zum Schaf konnte beim Rind in einigen Fällen während der Luteolyse ein weiterer kurzer und steiler Anstieg der Ocytocinkonzentration beobachtet werden (SCHAMS, 1983, BULLERMANN, 1984, BREITINGER, 1984).

1.6.1 Ocytocinkonzentrationen in verschiedenen Blutgefäßen

WALTERS & SCHALLENBERGER (1982, 1984) und WALTERS et al. (1984) entwickelten für das Rind eine Methode der Vena cava caud. Katheterisierung, mit dem Ziel, Blutproben möglichst nahe kranial der Einmündungsstelle der Vena ovarica zu gewinnen, d.h. möglichst unverdünntes ovarielles Blut zu erhalten. Mit diesem Verfahren konnte ein sehr ähnlicher Verlauf der Ocytocinkonzentrationen in der Vena jugularis und in der Vena cava caud. festgestellt werden, wobei die Werte in dem zuletzt genannten Gefäß zum Teil erheblich höher lagen (SCHAMS et al. 1983).

SCHALLENBERGER et al. (1984) zeigten, daß durch Cloprostenol (PGF_{2α}-Analog) eine erhöhte Ocytocinfreisetzung hervorgerufen wird. Bei einem Vergleich der beiden oben genannten Gefäße konnte nachgewiesen werden, daß der Anstieg in der Vena cava caud. (von ca. 8.2 auf etwa 2000 pg/ml Plasma) früher und wesentlich deutlicher erfolgte, als in der Vena jugularis (von 4.2 auf 700 pg/ml Plasma). Beachtenswert dabei ist auch der sehr ausgeprägte Unterschied in den absoluten Werten der beiden Gefäße. Diese Reaktion auf Cloprostenol-Applikation konnte nach Ovariectomie nicht mehr beobachtet werden.

1.6.2 Ocytocin und Beziehung zur Gelbkörperanzahl

Bei Superovulationsversuchen mit Färsen, die entweder mit PMSG oder mit FSH behandelt wurden und bei denen am zweiten Behandlungstag die Luteolyse durch Cloprostenol eingeleitet wurde, zeigte sich eine gute Korrelation zwischen der Anzahl der Follikel, beziehungsweise der Corpora lutea und dem Anstieg der Ocytocinkonzentration (SCHAMS, et al. in Druck).

1.6.3 Ocytocin in Corpus luteum Gewebeextrakten

Ebenso wie beim Schaf enthält auch das Corpus luteum Gewebe des Rindes eine beträchtliche Menge an Ocytocin. FIELDS et al. (1980) wiesen im bovinen Gelbkörper eine Substanz nach, die sich in ihrer biologischen Aktivität (Mäuseuterus-Kontraktionstest) wie Ocytocin verhält. WATHES et al. (1983 a, 1984) fanden einen Faktor mit biologischer Ocytocinaktivität und der gleichen Elutionsgeschwindigkeit bei Überprüfung mit einer Sephadex-G 50 und einer G 75 Säule, sowie mit HPLC, wie ein Ocytocin-Standard. FIELDS et al. (1983) konnten die kontrahierende Wirkung des von ihnen gewonnenen Corpus luteum Extraktes auf den Mäuseuterus durch vorherige Inkubation mit einem monoklonalen Ocytocin-Antikörper wieder aufheben. Auch sie erhielten übereinstimmende Elutionsgeschwindigkeiten ihres Extraktes mit einem Ocytocin-Standard.

1.6.4 Parallelität in der Freisetzung von Ocytocin und Neurophysin

Neurophysin I wurde von WATHES et al. (1983 a) im Rinder Corpus luteum gefunden. SCHAMS et al. (1984) zeigten, daß in Proben aus der Vena cava caud. Pulse von Ocytocin, Progesteron, immunoreaktiven Neurophysin I, PGF-Metabolit und Östradiol-17 β gleichzeitig auftreten.

Nach Cloprostenol-Behandlung stieg der Gehalt an immunoreaktiven Neurophysin I in der Vena cava caud. deutlicher und früher an als in der Vena jugularis.

Bei dem bereits oben erwähnten Superovulationsversuch (SCHAMS et al. in Druck), kam es neben dem Ocytocinanstieg auch zu einem Anstieg von immunoreaktiven Neurophysin I. Auch hier gab es eine enge Beziehung zwischen dem Gehalt und der Anzahl der Follikel bzw. der Gelbkörper.

2 Inkubationsversuche mit Ovargewebe

2.1 Inkubation von Corpus luteum Gewebestücken

Seit DUNCAN et al. (1960, 1961), sowie SUAREZ-SATO & LEGAULT-DEMARE (1960) gezeigt haben, daß Corpus luteum Gewebestücke weiterhin Progesteron freisetzen, wenn sie inkubiert werden, haben viele Untersucher in vitro Systeme für Gelbkörpergewebe zur Erforschung des Steroidsekreationsverhaltens benützt. Von MASON et al. (1962) ist der erste Bericht, daß LH bei inkubierten Corpus luteum Gewebestücken eine gesteigerte Progesteron-Synthese hervorruft. Ebenso konnten KALTENBACH et al. (1966) beim Schaf und ARMSTRONG & BLACK (1966) beim Rind zeigen, daß LH einen stimulierenden Einfluß auf die Progesteronabgabe inkubierter Corpus luteum Gewebestücke hat. CARLSON & BLACK (1969) wiesen eine verminderte in vitro Progesteron-Synthese bei Gelbkörpergewebeschnitten von Rindern nach, die ab dem dritten Tag nach der Brunst mit Ocytocin behandelt worden waren. Dieser Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zeigte sich sowohl mit als auch ohne Zusatz von LH zum Inkubationsmedium. Darüber hinaus war die Differenz bei Tieren, die an Tag acht post östrum ovariectomiert worden waren größer als bei Tieren, denen das Ovar bereits am fünften Tag entnommen worden war.

SHEMESH et al. (1975) fanden, daß aus Corpus luteum Gewebe in vitro neben Progesteron auch Testosteron in nicht unerheblichen Mengen freigesetzt wird. Die Abgabe von Testosteron wurde durch LH, Arachidonsäure und $\text{PGF}_{2\alpha}$ gesteigert. Die Progesteronfreisetzung wurde nur von LH und $\text{PGF}_{2\alpha}$ erhöht, Arachidonsäure zeigte keine Wirkung.

FLETCHER & NISWENDER (1982) führten Inkubationsversuche mit ovinen Corpus luteum Gewebeschnitten durch, denen sie $\text{PGF}_{2\alpha}$ alleine oder in Kombination mit LH zusetzten. Sie zeigten, daß $\text{PGF}_{2\alpha}$ alleine keinen Einfluß auf die Progesteron und c-AMP Produktion hatte. Bei Zusatz von $\text{PGF}_{2\alpha}$ und LH war nach einer Stunde keine unterschiedliche Progesteron und c-AMP Produktion im Vergleich zur mit LH inkubierten Probe zu sehen. Nach dreistündiger Inkubationsdauer zeigte sich ein hemmender Einfluß von $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf die LH-stimulierte Progesteron und c-AMP Akkumulation.

Ebenfalls in einer in vitro Studie mit Corpus luteum Gewebestücken zeigten SAWYER et al. (1979) eine enge Beziehung zwischen der LH und Kalzium-Ionophor A 23187 stimulierten Granulaformation und -freisetzung und der Progesteronsekretion. Sie vermuten, daß diese Granula ein Progesteron-Carrier-Protein enthalten.

2.2 Inkubationsversuche mit Corpus luteum Zellen

Die ersten Versuche zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension aus steroidproduzierenden Geweben wurden für die Nebennierenrinde beschrieben (HALKERSTON & FEINSTEIN, 1968, HALKERSTON et al. 1968, KLOPPENBURG et al. 1968). Eine ähnliche Methode wurde von SAYERS (1971) für das Corpus luteum entwickelt. Die erste Arbeit über Rindergelbkörper wurde 1972 von GOSPODAROWICZ & GOSPODAROWICZ veröffentlicht. Sie erhielten eine homogene Population von Luteinzellen durch Behandlung von Corpus luteum Stückchen mit Collagenase und Hyaluronidase, gefolgt von einer zweiten Behandlung mit Trypsin und Deoxyribonuklease. Diese Zellen sprechen wie auch Corpus luteum Gewebe auf LH-Stimulation an und die Autoren bemerkten, daß diese Präparation für das Studium des Langzeiteffektes von LH auf den Metabolismus von Lutealzellen in vitro geeignet sei.

Daß diese Methode nicht nur dafür geeignet ist, haben mittlerweile eine große Anzahl von Autoren mit Arbeiten über die Beeinflußbarkeit der in vitro Steroidsekretion, insbesondere der Progesteronsekretion, mit Hilfe der verschiedensten Substanzen bzw. mit der Hemmung derselben belegt.

Alle aufzuführen würde den Rahmen dieser Arbeit bei weiten sprengen, deshalb sei hier nur eine kleine Auswahl ohne jegliche Wertung getroffen.

2.2.1 Inkubationsversuche mit ovinen Corpus luteum Zellen

Bei Luteinzellen des Schafes wiesen JORDAN III et al. (1978) eine Steigerung sowohl der Progesteron als auch der c-AMP-Produktion durch Katecholamine und LH nach. FITZ et al. (1982) trennte die Corpus luteum Zellen in zwei Populationen (große Zellen: 23-35 μm Durchmesser und kleine Zellen: 12-22 μm Durchmesser) und fanden, daß große Lutealzellen etwa 20mal mehr Progesteron produzieren als kleine Lutealzellen. Die Fähigkeit der großen Zellen auf Stimulation durch LH und dbc-AMP (dibutyryl-c-AMP) zu reagieren allerdings betrug, verglichen mit den kleinen Zellen nur etwa 10 %. Entsprechend verhält sich auch die Anzahl der Rezeptoren für LH/hCG bei den beiden Zellgruppen. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch RODGERS et al. (1983). Sie stellten heraus, daß umgerechnet auf die Anzahl der Zellen die beiden Populationen (große und kleine Luteinzellen) in etwa die gleiche Basis-Progesteron-Sekretionsrate aufweisen. Sie halten nur die kleinen Zellen für LH-stimulierbar und daher für die Hauptquelle lutealer Progesteronproduktion beim Schaf.

2.2.2 Inkubationsversuche mit bovinen Corpus luteum Zellen

Beim Corpus luteum des Rindes trennten URSELY & LEYMARIE (1979) große (mittlerer Durchmesser: 37 μm) und kleine Zellen (mittlerer Durchmesser: 18 μm) durch deren unterschiedliches Sedimentationsverhalten voneinander ab. Anschließend untersuchten sie den initialen Progesterongehalt der Zellen sowie die Progesteronproduktion nach zweistündiger Inkubation mit und ohne LH-Stimulation. Der Progesterongehalt der großen Zellen war ca. zehnmal so hoch wie der der kleinen Zellen. Die unstimulierte Kontrollgruppe großer Zellen produzierte etwa 17mal mehr Progesteron, als die vergleichbare Gruppe kleiner Zellen. Nach Inkubation mit maximal effektiver LH-Konzentration hoben sich die Unterschiede in den Hormonspiegeln nahezu auf. Bei submaximaler LH-Konzentration war die Sensitivität der kleinen Zellen sogar 100 bis 1000 mal höher als die der Großen. Östradiol-17 β übte eine dosisabhängige Hemmung auf die LH-stimulierte Progesteron-Akkumulation bei beiden Zellgruppen aus. Diesen Befund konnten vorher bereits WILLIAMS et al. (1978) für die Gesamtzellfraktion des Rindergelbkörpers zeigen.

Den Effekt von in vivo PGF_{2 α} -Applikation auf die in vitro Progesteron-Synthese durch bovine Corpus luteum Zellen untersuchten WESTON & HIXON (1980). Sie stellten fest, daß die Progesteronkonzentration im Corpus luteum zum Zeitpunkt der Behandlung größer war, als zwei, vier oder acht Stunden nach der Prostaglandininjektion. Ohne Zusatz produzierten inkubierte Proben, die sofort und zwei oder vier Stunden nach Applikation entnommen wurden in etwa gleiche Mengen an Progesteron. Im Vergleich dazu synthetisierten die inkubierten Zellen der 8 Stunden Entnahme nur noch etwa die Hälfte. LH konnte bei allen Proben die Progesteronabgabe steigern. Auch der Zusatz von PGF_{2 α} zum Inkubationsmedium hatte eine akkumulationsfördernde Wirkung.

TAN et al. (1982) untersuchten den in vitro Effekt von Ocytocin auf bovine Corpus luteum Zellen der Frühgravidität. Niedere Ocytocinzusätze steigerten signifikant die Progesteron-Produktion dispergierter Lutealzellen nach drei Stunden Inkubationszeit. Höhere Ocytocinkonzentrationen hatten einen hemmenden Effekt auf die hCG-stimulierte Progesteron-Sekretion. Sie schlossen daraus auf einen möglichen Effekt von Ocytocin auf den bovinen Gelbkörper in der Frühgravidität. Auch halten sie eine Hemmung der basalen Progesteronsekretion durch Ocytocin für möglich.

Mit der Möglichkeit einer luteolytischen Wechselbeziehung zwischen Östradiolbenzoat (E_2 -Benzoat) und $PGF_{2\alpha}$ bei Kühen befaßten sich HIXON et al. (1983). Corpus luteum Zellen von Tieren, die an den Tagen zehn, elf und zwölf des Zyklus entweder mit E_2 -Benzoat oder mit dessen Trägerstoff behandelt worden waren, wurden mit LH und oder $PGF_{2\alpha}$ inkubiert. Unabhängig von der E_2 -Benzoat Vorbehandlung stimulierten sowohl LH als auch $PGF_{2\alpha}$ die Progesteronsynthese. Dieser Befund steht nicht mit den in vivo beobachteten Ergebnissen im Einklang, wo durch Kombination von E_2 -Benzoat und $PGF_{2\alpha}$ eine signifikante Zyklusverkürzung erreicht werden konnte. Der in vivo beobachtete Effekt konnte in vitro nicht nachvollzogen werden. Im Gegensatz dazu konnten MOODY & HANSEL (1971) und HANSEL et al. (1973) nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit Östadiol-Benzoat bei Corpus luteum Gewebestücken einen hemmenden Einfluß auf die LH-stimulierte Progesteron-Synthese beobachten.

MILVAE & HANSEL (1983 a) untersuchten die Wirkung des $PGF_{2\alpha}$ -Metaboliten 13,14-dihydro- $PGF_{2\alpha}$ bei Färsen in vivo und in vitro. Während bei ausreichender Dosierung Luteolyse und vorgezogene Brunst ausgelöst werden konnten, blieb ein Effekt auf die in vitro Progesteron-Akkumulation während einer zweistündigen Inkubationsperiode aus.

In einer Studie mit Corpora lutea periodica verschiedenen Alters (Zyklustage 5, 10, 15 und 18) untersuchten MILVAE & HANSEL (1983 b) die Prostacyclin (PGI_2), $\text{PGF}_{2\alpha}$ und Progesteron Produktion boviner Lutealzellen. Den inkubierten Zellen wurde LH bzw. verschiedene Mengen an Arachidonsäure (AA) jeweils mit und ohne PG-Synthetase-Hemmer Indomethazin zugesetzt. Der Gehalt und die Neusynthese von PGI_2 im Corpus luteum waren am Tag 5 größer als an den anderen Entnahmetagen. Mit AA konnte die Produktion an allen Tagen (exkl. Tag 5) gesteigert werden. Die Verhältnisse für $\text{PGF}_{2\alpha}$ waren ähnlich, auch hier wirkte AA fördernd und Indomethazin hemmend auf die Neusynthese. LH konnte weder die PGI_2 - noch die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Freisetzung an irgendeinem Zyklustag beeinflussen. Während in den jüngsten Corpora lutea mehr als viermal soviel PGI_2 wie $\text{PGF}_{2\alpha}$ anzutreffen war, war dieses Verhältnis bei den ältesten Gelbkörpern nahezu ausgeglichen. Die Progesteron-Produktion wurde mit zunehmenden Alter des Corpus luteum geringer. Im gleichen Maße nahm auch der Prostacyclingehalt ab. Auf Grund dieser Ergebnisse nehmen die Autoren an, daß Entwicklung, Blütestadium und Regression des bovinen Corpus luteum durch die Balance luteolytischer und luteotroper Prostaglandine, entweder uterinen oder ovariellen Ursprungs geregelt wird.

2.3 Inkubationsversuche mit Follikeln

In vitro Systeme für Follikel bzw. deren einzelne Zellpopulationen (Theka- und Granulosazellen) wurden und werden vor allem in Hinblick auf die Einführung des Embryotransfers, der Oocytenmanipulation und der in vitro Fertilisation entwickelt. Das Interesse gilt in diesem Zusammenhang insbesondere der hormonellen Ausstattung der Zellen sowie der Follikelflüssigkeit und den Veränderungen, die zur Reifung und schließlich zur Ovulation des Follikels führen.

Eine Richtung in diesen Untersuchungen betrifft dabei die Fähigkeit der Steroidsynthese und der Utilisation gewisser Vorläuferstoffe durch den Follikel. Der Regulierung dieser Vorgänge scheint eine essentielle Bedeutung in der Auswahl des zur Ovulation vorgesehenen Follikels zuzukommen.

2.3.1 Inkubationsversuche mit bovinen Follikeln

Rinder-Granulosazellen verlieren nach der Luteinisierung die Fähigkeit Androgene zu aromatisieren, d.h. der Östrogenbildung weitgehend (HENDERSON & MOON, 1979). FORTUNE & HANSEL (1979) zeigten, daß hohe Östradiol-17 β Konzentrationen, wie sie im praeovulatorischen Follikel des Rindes vorkommen, einen inhibierenden Einfluß auf die in vitro Progesteronsekretion durch Granulosa- und Thekazellen haben. Auch nach Zusatz von LH blieb der hemmende Einfluß erhalten.

Die vor, während und nach dem praeovulatorischen LH-Gipfel bis hin zur Ovulation in den Steroidkonzentrationen, sowie in der Mikromorphologie auftretenden Veränderungen des Follikels beim Rind untersuchten DIELEMAN et al. (1983). Östradiol ist vor dem LH-Gipfel hoch, fällt in den ersten sechs Stunden danach etwas, in dem sich anschließenden Zeitraum sehr rasch ab. Progesteron steigt nach dem LH-Gipfel

kurz an, fällt wieder ab, um dann kurz vor der Ovulation sehr steil anzusteigen. Testosteron ist relativ hoch zu Beginn der Untersuchung, steigt unmittelbar nach dem LH-Gipfel noch einmal kurz an und sinkt schließlich auf sehr niedrige Werte ab. Die Schichtdicke der Theka-Zelllage und die Größe der Granulosazellen liegt bereits vor dem LH-Gipfel über den Werten normaler nicht atretischer, antraler Follikel. In den ersten sechs Stunden nimmt die Dicke der Theka-Schicht um ca. 40 % zu und geht anschließend wieder auf ursprüngliche Werte zurück. Gleichzeitig mit dem Auftreten hoher Progesteron-Konzentrationen kurz vor der Ovulation kann eine Größenzunahme der Granulosazellen um 39 % beobachtet werden. Die Autoren nehmen als Ursache für die Veränderungen im Steroidgehalt und in der Mikromorphologie den praeovulatorischen LH-Gipfel an.

McNATTY et al. (1984) untersuchten die in vitro Steroidogenese der Theka interna boviner Follikel im Perfusionssystem. Sie fanden eine für alle Follikel gleiche, relative (bezogen auf die Masse) Androstendion-Produktion. D.h. mit steigendem Follikeldurchmesser erhöhte sich auch die Androstendion-Freisetzung. Unabhängig voneinander konnten sowohl eine Erhöhung der Durchflußrate als auch die Zugabe von LH die Ausschüttung von Androstendion erhöhen. Der Progesteronanteil an der gemessenen Steroidproduktion betrug 1 % bei Theka Gewebe. Bei einer vergleichbaren Versuchsanordnung mit Granulosa Zellen war Progesteron mit 80 % vertreten.

2.3.2 Inkubationsversuche mit ovinen Follikeln

Auch beim Schaf zeigt sich eine deutliche Verschiebung im Steroidproduktionsmuster nach dem LH-Gipfel und der Ovulation von den C-18 Steroiden hin zu den C-21 Steroiden (MOOR et al. 1975). Nach Untersuchungen von MOOR (1977) werden Androgene in der Theka gebildet und in der Granulosa zu Östrogenen aromatisiert. Für diesen Vorgang ist der direkte Kontakt zwischen diesen beiden Zellschichten notwendig.

WEISS et al. (1978) untersuchten die Reaktion der Granulosa- und der Thekazellen auf Gonadotropinzusatz in vitro. HCG steigerte die c-AMP Produktion kleiner und großer Follikel, FSH zeigte keine Wirkung. Granulosazellen kleiner Follikel reagierten nicht auf hCG, aber auf FSH-Zusatz mit einer gesteigerten c-AMP Produktion. Bei Granulosazellen großer Follikel zeigten beide Gonadotropine eine stimulierende Wirkung.

3 Ocytocin in steroidproduzierenden Geweben von Mensch und Ratte

Die Hypothese, daß Ocytocin im Gelbkörper eng mit der Steroidsynthese gekoppelt ist, veranlaßte zu der Vermutung, daß eine Beziehung zwischen Ocytocinanwesenheit und Steroidsynthese bestehen könnte.

So wurde bei der Ratte ein hemmender Einfluß von Ocytocin (sowie Vasotocin und Vasopressin) auf die testikuläre Androgensynthese *in vitro* beobachtet (ADASHI & HSUEH, 1981). FIELDS et al. (1983) fanden immunreaktives Ocytocin in Extrakten aus der Plazenta der Frau, einem Gewebe, das ebenfalls als Steroidproduzent bekannt ist.

NICHOLSON et al. (1983) versuchten Ocytocin auch in anderen steroidproduzierenden Geweben nachzuweisen. Gewebeextrakte von Hoden, die von aus medizinischen Gründen orchiektomierten Patienten stammten, und von Nebennieren aus menschlichen Feten postmortal gewonnen, wurden untersucht. Auch Rattenhodenextrakt, gepoolt aus den Hoden von fünf Ratten wurden analysiert. Sowohl im Hoden des Mannes, als auch in dem der Ratte konnte immunreaktives Ocytocin nachgewiesen werden. Die Gonaden beider Spezies enthielten außerdem immunreaktives Neurophysin. Auch die Analyse des fetalen Nebennierengewebes hatte den Ocytocin-Immunoreaktivitätsnachweis als Ergebnis. Für alle untersuchten Gewebe konnten die gefundenen Ergebnisse mit Hilfe der HPLC bestätigt werden.

Auf Grund der Höhe der gefundenen Konzentrationen glauben die Autoren nicht, daß der Ocytocingehalt in den untersuchten Organen durch die im Blut zirkulierenden Mengen erklärt werden kann. Auch das gleichzeitige Auftreten von Neurophysin weist eher auf eine lokale Synthese hin.

Eigene Untersuchungen sollten zur weiteren Klärung beitragen. Dazu wurden zuerst die Ocytocingehalte verschiedener am Reproduktionsgeschehen beteiligter Organe beim weiblichen und männlichen Rind, einschließlich der Nebennieren, untersucht.

Im zweiten Teil wurden Follikel, bzw. deren Zellpopulationen Granulosa- und Thekazellen, sowie Corpus luteum Gewebe und Zellen in vitro inkubiert. Dabei wurde das Hormonfreisetzungsverhalten, mit spezieller Berücksichtigung des Ocytocins untersucht. Überprüft wurde auch die Beeinflußbarkeit der Ocytocinabgabe aus Corpus luteum Gewebe und Zellen in vitro. Die Frage, ob aus den Versuchen auf eine lokale Ocytocinsynthese im bovinen Gelbkörper geschlossen werden kann, wird diskutiert.

III MATERIAL UND METHODEN

1 Gewinnen der Proben

Die Proben sowohl für die Extraktion als auch für die Inkubationsversuche wurden am Schlachthof gewonnen. Das Material setzte sich fast ausschließlich aus Tieren der Rasse Deutsches Fleckvieh zusammen. Der Zeitraum vom Töten der Tiere bis zur Entnahme der Gewebe betrug bei Ovar, Hoden, Prostata und Samenblasendrüse ca. 10 min., bei den Nebennieren, bedingt durch den Schlachtprozess, etwa 20 min.. Zur Beurteilung des Zyklusstandes und um eine Trächtigkeit auszuschließen, wurde bei der Gewinnung eines Ovars jeweils das kontralaterale Organ, sowie der Uterus mituntersucht und der Befund protokolliert. Bei den untersuchten Corpora lutea grav. wurde die Dauer der Trächtigkeit durch Bestimmung der Scheitel-Steiß-Länge ermittelt (HABERMEHL 1975).

1.1 Gewinnen der Proben für die Gewebeextraktion

Die Gelbkörper die für die Gewebeextraktion vorgesehen waren, wurden sofort enukleiert und vom umgebenden Bindegewebe befreit.

Die Zerkleinerung aller Proben für die Alkoholextraktion erfolgte bereits an Ort und Stelle. Das Gewebe wurde auf einer Aluminiumplatte so zerkleinert, daß die Größe der Stücke unter 2 mm lag. Diese Stücke wurden sofort in Äthanol (98 %ig, p.a.) verbracht und in Eiswasser gekühlt ins Labor transportiert.

In Versuch Nr. 2 mit Nebennieren wurden Mark und Rinde getrennt untersucht. Die Aufteilung in die beiden Gewebearten wurde ebenfalls bereits am Schlachthof vorgenommen. Dabei wurde versucht die Verbindungsstelle der beiden Anteile nicht mit in die Proben zu nehmen. Dazu wurde ein Teil der Nebenniere in Scheiben geschnitten und anschließend diese Scheibchen in die beiden Anteile aufgetrennt.

Bei relativ großen Organen wie Hoden und Nebenniere wurde jeweils nur ein ca. 3-5 Gramm schweres Stück für die weitere Untersuchung entnommen. Das Gewebe für die Hodenprobe stammte dabei aus dem Mittelstück des Organs. Von der herzförmigen Nebenniere wurde ein halbkugelförmiges Ende für die Untersuchung abgetrennt.

1.2 Gewinnen der Proben für die Inkubationsversuche

Soweit nicht steriles Einmalmaterial zur Verwendung kam, sind alle verwendeten Instrumente, Glaswaren und sonstigen Geräte hitzesterilisiert bzw., wenn materialbedingt erforderlich, autoklaviert worden. Das für alle Arbeitsvorgänge verwendete Medium wurde mit einer Membranfiltervorrichtung entkeimt.

Proben für die Inkubationsversuche wurden unter möglichst sauberen Bedingungen gewonnen, in Medium mit Antibiotikazusatz gewaschen und in dieser Nährlösung eiswassergekühlt ins Labor transportiert.

1.3 Gewinnen der Follikelflüssigkeit

Die Follikelflüssigkeit wurde durch Punktion und Ausaugen mit Kanülen oder Eröffnen in Puffer (1 ml) gewonnen. Die dabei verwendeten Spritzen erlaubten durch ihre feine Einteilung eine relativ genaue Bestimmung des Flüssigkeitsvolumens. Nach Abfüllen in Plasmaaufbewahrungsröhrchen wurden die Proben sofort in einem Behälter mit Trockeneis tiefgefroren.

Für die histologische Untersuchung wurde jeweils ein Stück der Follikelwand vorsichtig herauspräpariert und in Bouin'scher Lösung fixiert. Die Anfertigung der Präparate und deren Beurteilung erfolgte im Labor von Dr. Kruip, Utrecht. In die Auswertung wurden nur laut histologischem Befund nicht atretische Follikel aufgenommen.

2 Extraktion aus Gewebe

Nachdem durch Rückwiegen des Transportbehälters (mit Alkohol) das Gewicht der Probe festgestellt wurde, erfolgte die Extraktion für alle Proben gleichermaßen nach folgendem Schema:

Zuerst wurde das gemessene Gewicht mit 9 multipliziert; die so errechnete Zahl ergab die für die Extraktion notwendige Menge an Äthanol. Die bereits in den Transportbehältern vorliegende Menge an Alkohol ging dabei in die Berechnung mit ein.

Das Gewebe wurde mit der halben Menge des Äthanols versetzt und zweimal 30 sec. mit einem Homogenisator auf höchster Stufe zerkleinert. Diese Dauer war in jedem Fall ausreichend, um ein feines Homogenisat herzustellen. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (2000 upm/10 min), der Überstand gesammelt, der Rückstand mit der zweiten Hälfte des Alkohols versetzt und der Vorgang wiederholt. Die beiden Überstände wurden gepoolt und bis zur völligen Trockenheit im Vakuumschrank eingengt.

Dieser Vorgang nahm je nach Alkoholmenge 12-20 Stunden in Anspruch. Anschließend wurde der Rückstand in Phosphatpuffer (0.05 m, pH 7.5) aufgelöst und über eine C-18 Kartusche gereinigt. Der Vorgang entspricht ab hier genau dem für die Aufarbeitung von Plasmaproben üblichen Verfahren (SCHAMS, 1983). Der so gewonnene Extrakt wurde in mehreren Verdünnungen im RIA eingesetzt.

Zur Überprüfung der Verluste durch das Extraktionsverfahren, wurde einigen Proben Tritium-markiertes Ocytocin zugesetzt. Es ergab sich dabei eine durchschnittliche Wiederfindung von ca. 70 % für Corpus luteum Gewebe und von ca. 80 % für das Hodengewebe (siehe Tab. 1). Für das Corpus luteum Gewebe zeigte sich dabei eine Abhängigkeit vom Alter des Organs. Bei alten Corpora lutea mit relativ hohem Bindegewebsanteil war die Wiederfindung deutlich niedriger.

Tab. 1 Wiederfindung (Wdf.) zugesetzten ^3H -Ocytocins bei Äthanolextraktion

C.l. Nr.	Zyklustag	Wdf. %	Ø Wdf %
1	6 - 7	79,2	69,8
2	6 - 7	68,1	
3	12 - 14	75,8	
4	12 - 14	75,3	
5	18 - 20	67,8	
6	18 - 20	52,4	
Hoden Nr.			
1		81,3	81,8
2		79,9	
3		84,3	

3 Inkubation von Gewebestücken und Zellen

Die Bearbeitung der Proben für die Inkubation erfolgte unter möglichst keimarmen Bedingungen.

Mit Hilfe der bereits am Schlachthof erhobenen Befunde wurde nun die Zuordnung der Proben zu einem bestimmten Zyklusstand vorgenommen.

Dabei wurde die Einteilung der Follikel nach den von KRUIP & DIELEMAN (1982) erarbeiteten Richtlinien durchgeführt. Abhängig vom Aussehen, Art der Vaskularisation, Transparenz und Zustand der Follikelflüssigkeit erfolgte eine Einteilung in nicht atretisch, leicht atretisch, intermediär und stark atretisch. Für die Inkubationsversuche wurden nur nicht atretische Follikel verschiedener Größe und verschiedener Zyklusstadien verwendet.

Für die Beurteilung der Corpora lutea wurden die von OKUDA (1982) und STOCK (1984) zusammengefaßten Kriterien zu Grunde gelegt. Als Parameter fungierten dabei Form, Lage im Ovar, Konsistenz, Kapselbildung und Farbe des zu klassifizierenden Gelbkörpers. Corpora lutea, bei denen die Untersuchung des Uterus eine Gravidität ergab, wurden für Inkubationsversuche nicht verwendet.

Vor einer weiteren Behandlung wurden die Ovarien nochmals in antibiotikahaltigem Medium gewaschen.

3.1 Inkubation von Follikeln.

3.1.1 Inkubation ganzer Follikel

Die in Absatz III 3.1 und 3.2 beschriebenen Versuche wurden von Dr. Kruip durchgeführt. Im Rahmen der Zusammenarbeit mit unserem Institut stellte er uns die Proben für die Ocytocin-analyse zur Verfügung.

Im ersten Versuch erfolgte die Inkubation der Follikel in herkömmlicher Weise auf Gitternetzen (37°C , 95 % O_2 , 5 % CO_2). Dem Medium war in einer der drei Serien bovines Serumalbumin (BSA) anstatt des üblichen Serums zugesetzt. Die Inkubation im zweiten Versuch erfolgte mit dem sogenannten "Continuous Flux System". In diesem Fall wird der Follikel ständig von einer definierten Menge Mediums (30 ml) sozusagen im "Kreisverkehr" umspült. Das Medium wird dabei nicht gewechselt. In bestimmten Zeitabständen werden diesem Medium Proben entnommen und das entnommene Volumen durch frisches Medium ersetzt (KRUIP, 1983).

3.1.2 Inkubation von Granulosa- und Theka Zellen

Dieser Versuch wurde zusammen mit Dr. Kruip an unserem Institut durchgeführt.

Die Follikel wurden mit Hilfe zweier Skalpelle möglichst schonend aus dem Ovar getrennt. Die endgültige Freipräparierung erfolgte unter dem Stereomikroskop mit zwei Uhrmacherpinzetten. Dabei wurde durch vorsichtiges Zerreißen Schicht für Schicht abgetragen, so daß zum Schluß nur noch die Theka erhalten war. Anschließend wurde der Follikel in einer Petrischale mit einer definierten Menge Medium geöffnet, die Follikelflüssigkeit für die spätere Analyse gesammelt und sofort bei -20°C gelagert. In einer weiteren Schale, ebenfalls mit einer bestimmten Menge an Medium,

wurde die Follikelhülle umgedreht. Unter vorsichtigem Abstreifen mit der Pinzette erfolgte die Ablösung der Granulosazellen. Das Thekagewebe wurde bis zur weiteren Bearbeitung in Medium verbracht.

Die Granulosazellen wurden nun abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet erneut in einer definierten Menge Medium aufgenommen. Nun erfolgte die Zellzählung mit einer Türk'schen Zählkammer und die Beurteilung der Überlebensrate mit Hilfe einer Lebend-tot-Färbung (Trypanblau-Ausschlußfärbung, TENNANT, 1964). Die Zellen jedes Follikels wurden auf drei Petrischalen verteilt und inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde für die Proteinbestimmung verwendet. Das Inkubationsvolumen betrug 2 ml. Inkubiert wurde bei 37°C, Luft/CO₂-Gemisch (95/5%) und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Nach der im Versuchsplan vorgesehenen Dauer wurden die Proben aus dem Inkubator entnommen, das Medium abgehebert, zentrifugiert (3000 upm / 10 min.), der Überstand in Aufbewahrungsröhrchen dekantiert und bis zur Analyse bei -20°C tiefgefroren.

Die Inkubation des Thekagewebes erfolgte in gleicher Weise. Dazu wurde die Follikelhülle in drei etwa gleichgroße Stücke zerteilt. Die Gewebsintegrität der einzelnen Teile wurde durch vorsichtiges Zerreißen mit den feinen Pinzetten weitestgehend aufgehoben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Thekagewebe wieder gesammelt und für die Proteinbestimmung aufbewahrt.

3.2 Inkubation von Corpus luteum Gewebestücken.

Die Corpora lutea wurden mit Hilfe von Schere und Pinzette aus dem Ovar herausgelöst und mit einer Rasierklinge in dünne in etwa gleichgroße Gewebestücke geschnitten. Dabei wurde auf die Entfernung sichtbarer bindegewebiger Anteile geachtet. Nach neuerlichem Waschen in antibiotikahaltiger Nährlösung wurde jedes Gewebestück in ein Inkubationsgefäß verbracht, mit einem Sauerstoff/Kohlendioxidgemisch (95/5 %) begast und verschlossen. Die Inkubation erfolgte im Wasserbad mit einer Schüttler-Einrichtung so, daß immer eine leichte Bewegung im Inkubationsmedium war. Für jede unterschiedliche Behandlung und Inkubationsdauer wurden sechs Parallelproben angesetzt. Nach Ablauf der festgelegten Zeit wurde das Medium abgehebert und für die spätere Untersuchung im Gefrierschrank aufbewahrt. Zur Feststellung des Gewichtes wurden die Gewebestücke kurz auf Filterpapier abgetupft und unverzüglich gewogen (Genauigkeit: 0.1 mg).

3.3 Herstellung und Inkubation von Corpus luteum Zellsuspensionen

Die Herstellung der Zellsuspension erfolgte nach der etwas geänderten Methode von GOSPODAROWICZ & GOSPODAROWICZ (1971; 1972). Für die enzymatische Auftrennung wurden die von STOCK (1984) beschriebenen Enzyme verwendet.

Das aus seiner bindegewebigen Hülle gelöste Corpus luteum wurde in ca. 1x1 mm große Würfel geschnitten. Diese kommen für 30 min bei 37°C in eine 0.15 %ige Collagenase Lösung (10 ml / g Gewebe). Während dieses ersten und der folgenden Behandlungsschritte wird die Suspension ständig gerührt. Anschließend läßt man die Stücke etwas sedimentieren und verwirft den Überstand. Das Sediment wird in etwa 20 ml Pankreatinlösung (0.5 %ig) aufgenommen und weitere 10 min. unter den gleichen Bedingungen behandelt. Nach neuerlichem

Absetzen und dekantieren wird dieser Vorgang dreimal wiederholt. Ein mikroskopische Überprüfung des Überstandes zeigt, das dieser vor allem Zelltrümmer und Blutzellen, aber auch schon etliche einzelne Luteinzellen enthält.

Nach der letzten enzymatischen Behandlung werden die Gewebestücke dreimal mit frischen Medium gewaschen. Die nun sehr brüchigen Gewebestücke werden mit Pipetten abnehmenden Innendurchmessers mehrmals aufgesaugt. Dies führt zu einer Auftrennung des größten Teils der Fragmente in einzelne Zellen oder kleine Zellverbände. Als letzter Schritt wird die Suspension durch ein feinmaschiges Netz gefiltert, um noch vorhandene größere Gewebetrümmer abzutrennen. Nach Zentrifugieren (800 upm / 7 min.) und Verwerfen des Überstandes werden die Zellen in ein definiertes Volumen Inkubationsmedium aufgenommen und mit Hilfe von Pipetten wieder in eine homogene Suspension gebracht. Nach Zellzählung und Beurteilung der Vitalität nach der für die Granulosazellen beschriebenen Methode, sowie einer eventuell notwendigen weiteren Verdünnung können die Zellen im Versuch eingesetzt werden.

Die Zellzahlen in den einzelnen Versuchen lagen zwischen $2-4 \times 10^5$ Zellen pro ml Inkubationsansatz. Gezählt wurden nur nicht angefärbte, also lebende Zellen. Der Prozentsatz vitaler Zellen lag in den beschriebenen Versuchen zwischen 78 und 86 %. Für jede unterschiedliche Behandlung gab es jeweils vier Parallelproben.

Für die Bestimmung des Nullwertes wurde ein einfaches und ein doppeltes Aliquot der Zellsuspension mit der zugehörigen Menge Medium versetzt und nach Durchmischen sofort zentrifugiert, die Flüssigkeit dekantiert, gesammelt und eingefroren. Der in dieser Nullprobe gefundene Wert, wurde bei der anschließenden Hormonanalyse von der am Ende der Inkubationsdauer im Medium vorhandenen Hormonmenge abgezogen. Damit sollte vermieden werden, daß durch die Aufarbeitung freigesetztes und in die Probe gelangtes Hormon mit in die Berechnung eingeht.

3.4 Versuchsaufbau der Inkubationsversuche mit Corpus luteum Gewebestücken bzw. Zellen (siehe auch Abb. 2)

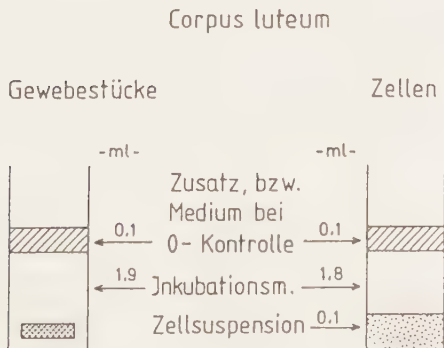
Alle den Proben zugesetzte Hormone wurden in Inkubationsmedium so verdünnt, daß die für die gewünschte Endkonzentration notwendige Stoffmenge in 0.1 ml enthalten war.

Jede Serie hatte eine Gruppe unbehandelter inkubierter Proben und eine Gruppe mit hCG behandelter inkubierter Proben als Kontrolle. Mit Hilfe des aus der Literatur hinreichend bekannten stimulierenden Effektes von hCG auf die Progesteronfreisetzung wurde das Funktionieren der Testsysteme überprüft.

War ein Versuch so angelegt, daß er über mehrere verschiedene Inkubationszeiten lief, so enthielt jeder Zeitabschnitt diese beiden Kontrollen.

Der genaue Versuchsaufbau der einzelnen Experimente ist den im Ergebnisteil jeweils beigefügten Tabellen zu entnehmen.

Abb. 2 Zusammensetzung des Probenvolumens bei den Inkubationsversuchen



4 Hormonanalysen

4.1 Radioimmuntest

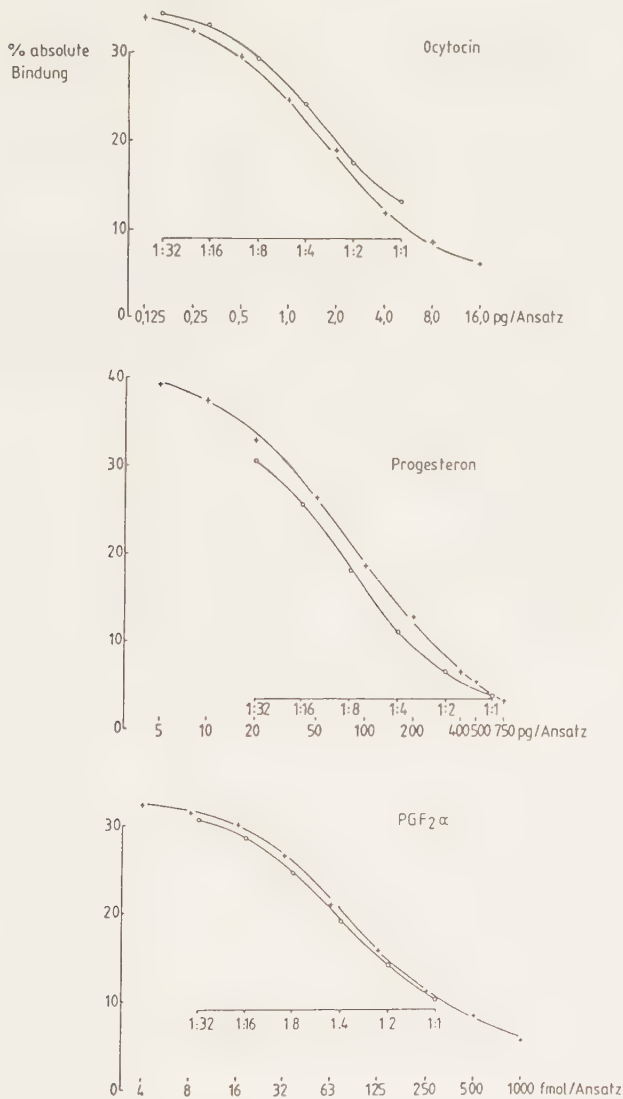
Im Rahmen der Teamarbeit am hiesigen Institut wurden die Hormonanalysen zum Teil von anderen Labors durchgeführt und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Dies gilt insbesondere für die Untersuchung der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Werte, die unter der Leitung von Dr. H.H.D. Meyer erfolgte.

In allen Proben wurde der Gehalt an Progesteron und Ocytocin untersucht. Zusätzlich dazu liegen bei einem Teil der Proben auch Ergebnisse über den Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ -Gehalt vor. Progesteron wurde nach der von HOFFMANN et al. (1973) entwickelten Methode getestet. In Abwandlung dieser Methode kam ein sogenannter "Direkttest" zur Anwendung. Dabei wird die zu untersuchende Probe nicht mehr extrahiert, sondern nach vorausgegangener Verdünnung "direkt" im RIA eingesetzt. Die Möglichkeit dazu ergab sich aus zwei Gründen. Erstens war es notwendig, die Proben auf Grund der sehr hohen Konzentrationen sehr stark zu verdünnen. Zweitens waren die Mediumproben von vorneherein nicht mit den Problemen der Serumproben (hoher Proteingehalt) behaftet, die eine Extraktion notwendig machen.

Ocytocin wurde nach der von SCHAMS (1983), $\text{PGF}_{2\alpha}$ nach der von MEYER et al. (1984) entwickelten Methode, ebenfalls im "Direkttest", untersucht.

Zur Kontrolle des Direkttestes wurden Verdünnungsreihen von Mediumproben hergestellt und deren Parallelität mit der jeweiligen Standardkurve überprüft. Dabei ergab sich für Progesteron, Ocytocin und $\text{PGF}_{2\alpha}$ eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Standard (siehe Abb. 3).

Abb. 3 Vergleich von Standardkurve und Verdünnungsreihe einer Mediumprobe



4.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur weiteren Überprüfung der Ocytocinanalysen wurden außerdem stichprobenartig aus den einzelnen Versuchen Proben mit Hilfe der HPLC untersucht. Als stationäre Phase diente dabei eine C-18 Säule. Die mobile Phase war ein Methanol/Trispuffer-Gemisch (1/1), es wurde ein isogrades Elutionsverfahren verwendet. Die Durchflußrate war 1ml/min. Nach einer Vorlaufzeit von 2 min. wurde die Probe auf die Säule aufgetragen und das Eluat fraktioniert gesammelt.

Zur Kontrolle bildeten Anfang und Ende jeder Testserie Läufe mit ^3H -Ocytocin. Das Fraktionsvolumen war hier 0.4 ml, das direkt in Teströhrchen gesammelt wurde und nach Zusatz von Szintillatorflüssigkeit sofort gemessen werden konnte. Auf diese Weise war es möglich Verluste durch die Chromatographie zu bestimmen. Die Wiederfindung betrug im Mittel aller durchgeführten Tests 94.4 % (s: ± 3.2 % n = 8).

Bei den übrigen Proben, bzw. Standards, war die Fraktionsgröße 0.2 ml. Auch hier wurde das Eluat gleich in den Teströhrchen gesammelt, über Nacht im Trockenschrank eingengt, mit Albuminpuffer aufgenommen und im RIA eingesetzt. Zur Überprüfung der Verluste durch diese Vorgänge wurde von jeder Probe ein Teil direkt im RIA eingesetzt. Die durchschnittliche Wiederfindung war 83.2 % (s: ± 12.2 %, n=10).

5 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung für die im Abschnitt 3.1.2 (Granulosa- und Thekazellen) beschriebenen Proben erfolgte kolorimetrisch. Als Farbreagenz wurde Serva Blau G verwendet.

Nach Einfrieren und wieder Auftauen, wurden die Zellen in Dithiotreitol-Phosphatpuffer suspendiert und mit einem Ultraschall-Homogenisator zerstört. Der nach dem Zentrifugieren (3000 upm / 10 min. / 4°C) gewonnene Überstand wurde in mehreren Verdünnungen mit dem Farbreagenz versetzt. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin. Die Proben wurden im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Der so erhaltene Wert wurde in die Standardkurve eingesetzt und der Proteingehalt berechnet.

6.Zusammenstellung der wichtigsten Geräte und Reagenzien

Geräte

Filtrationsgerät	Polycarbonat-Filtrationsgerät Sartorius SM 16508B
Filter	Zellulosenitrat SM 28-11307
Homogenisator	IKA-Ultra-Turrax T 18/10
HPLC	
Pumpen	"µ-Flow" Beckman 112 Solvent Delivery Module
Probengeber	Altex vent 210
Säule	"reversed phase" Altex Ultrasphere- ODS (dp 5µ 4.6mm ID x 25cm)
Thermostat	Haake Typ FE
Fraktionssammler	Fraction collector FRAC-100 Pharmacia Fine Chemicals
Inkubator	CO ₂ -Inkubator T 303 Assab Medicine AB
Mikroskop	Forschungsmikroskop Universal II Zeiss, Objektive: Neofluar 6.3-0.20 Neofluar 40-0.75, KPL-Weitwinkel- okular 10x Stereomikroskop Wild Typ 355 110
Multischalen	Nuncolon Delta 133 x 88 mm, 6 Vertiefungen, Nunc-Intermed
pH-Meter	pH Digi 520 WTW
Photometer	Spektralphotometer PM QII / M4 QIII Carl Zeiss

Schüttlerwasserbad	Köttermann Typ 3047
Ultraschallhomogenisator	MSE
Vakuumschrank	RVT 360 Heraeus Hanau
Waagen	Mettler M5 SA Sartorius 2001 MP2
Zentrifugen	Varifuge K Heraeus CHRIST Sigma 4K-1 Martin CHRIST
Biochemica	
Cloprostenol	Estrumate ^R PGF _{2α} -Analog ICI-Pharmaceutical Division Alderley Park Macclesfield
Collagenase	aus Cl. histolyticum 131 units/mg Gibco Lab. Grand Island N.Y.
FSH - NIH-S6	National Institut of Health USA
hCG	Prolan ^R Bayer Leverkusen
Indomethazin	Sigma No. I-7378
LH - NIH-B8	National Institut of Health USA
Medium 199	Modified (mit Earles Salzen mit Glutamin und 20 mM Hepes, ohne Natriumbicarbonat) Flow Lab.

Ocytocin	- 4.Int. Standard für Ocytocin - Sandoz, 200 I.E./ml Ch.Nr. 79010 - (tyrosyl-H ³)Oxytocin spec. act. 24.7 mCi/mg, Amersham
Östradiol-17 β	Serva 31100
Pancreatin	4 x N.F. Gibco Laboratories Grand Island N.Y.
PGE ₂	Prostaglandin E ₂ rein min. 95% Serva 33733
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α} pharm. Serva 33735
PGI ₂	Iloprost ^R PGI ₂ -Analog Schering
Progesteron	Steraloids Inc. Q 2600
Serum Albumin vom Rind	(BSA) Behring Institut
Trypanblau	Serva 37252

Nähr- und Pufferlösungen

Phosphatpuffer 0.5 M pH 7.5

pro Liter: 74.48 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O (Merck Art. 6580)
11.17 g KH₂PO₄ (Merck Art. 4873)
Aqua bidest. ad 1000 ml
pH mit 1 N HCl einstellen

für Phosphatpuffer 0.05 M pH 7.5 1:10 mit Aqua bidest.
verdünnen

Albuminpuffer 0.05%

pro Liter: 100 ml Phosphatpuffer 0.5 M pH 7.5 (s.o.)
500 mg human Albumin (Behring Institut)
1.8 g Titriplex III (EDTA, Merck Art. 8418)
Aqua bidest. ad 1000 ml

Dithiotreitolpuffer

pro Liter: 100 ml Phosphatpuffer 0.5 M pH 7.5 (s.o.)
462 mg Dithiotreitol (Sigma D 0632)
Aqua bidest. ad 1000 ml

Trispuffer pH 8.5

pro Liter: 2.42 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck
Art. 8362)
200 ml Methanol (p.a. J.T. Baker Chemicals)
Aqua bidest. ad 1000 ml
pH mit 1 N HCl einstellen

Nährlösung (Medium 199)

pro Liter: 14.66 g Medium 199 (Trockensubstanz)
2.20 g NaHCO_3 (Merck Art. 6329)
58 mg Ascorbinsäure L(+) (Merck Art. 500074)
100 000 I.E. Penicillin (P.-Na-Salz Hoechst)
0.1 g Streptomycin (Dihydro-Streptomycin-
sulfat Serva Biochem.)
2 mg Amphotericin B^R (Trockensubstanz
Squibb)

Für die Zelldispergierung wurden mit diesem Medium eine 0.15%ige Collagenase-, bzw. eine 0.5%ige Pancreatinlösung hergestellt. Für die Inkubation wurden entweder 10% Pferdeserum (Kälberserum bei den von Dr. Kruip in Utrecht durchgeführten Versuchen) oder BSA (0.5%) zugesetzt. Corpus luteum Gewebestücke wurden in Medium mit BSA (0.5%), Gelbkörperzellen in Medium mit Pferdeserum (10%) inkubiert.

III ERGEBNISSE

1 Ergebnisse der Gewebeextraktionen

1.1 Ocytocingehalt in Äthanolextrakten aus Hoden und akzessorischen Geschlechtsdrüsen beim Bullen

Das Ergebnis ist in Tabelle 2 zusammengefaßt

Die Analyse der Glandula vesicularis und des Corpus prostaticae erbrachte keine meßbaren Mengen an Ocytocin. In keinem der jeweils sechs untersuchten Organe wurde die durch den Aufarbeitungsmodus bedingte untere Meßgrenze von 5 pg/g Naßgewicht überschritten.

Im Hodenextrakt ergab die Untersuchung eine durchschnittliche Gewebeskonzentration von 53 pg (s: 23.6 pg) immunreaktives Ocytocin pro Gramm Naßgewicht.

Tab. 2 Ocytocingehalt in Hoden und akzessorischen Geschlechtsdrüsen beim Bullen (Mittelwert $\pm$ s)

Gewebe	n	Ocytocin pg/g Naßgewicht
Samen- blasendrüse	6	<5
Prostata (corpus)	6	<5
Hoden	9	53 $\pm$ 23.6

1.2 Ocytocingehalt in Äthanolextrakten aus Nebennieren des Rindes

In Versuch 1 wurde das Gesamtgewebe (ohne Trennung in Mark und Rinde) extrahiert. Das Ergebnis ist aus Tabelle 3 ersichtlich.

Tab. 3 Versuch 1: Ocytocingehalt in Nebennieren männlicher und weiblicher Rinder (Mittelwert $\pm$ s)

Geschlecht	n	Ocytocin pg/g Naßgewicht
♀	6	100 $\pm$ 71
♂	6	91 $\pm$ 39

Beträchtliche Unterschiede ergab die Untersuchung von Nebennieren weiblicher Tiere auf ihren Ocytocingehalt. Der niedrigste gefundene Wert pro Gramm Naßgewicht lag bei 28 pg, der höchste bei 217 pg. Der Durchschnittswert von 100 pg/g Naßgewicht (s: 71 pg) war dem in Nebennieren männlicher Tiere sehr ähnlich (91 pg/g Naßgewicht, s: 3.9pg). Im Gegensatz zur ersten Gruppe traten hier jedoch kaum Schwankungen in den Konzentrationen auf.

Der Bereich, in dem sich die Werte bewegten, reichte bei männlichen Tieren von 86 - 96 pg/g Naßgewicht.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Nebennierenmark und -rinde von weiblichen Tieren getrennt extrahiert. Das Ergebnis ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4 Versuch 2: Ocytocingehalt in Nebennierenrinde und -mark weiblicher Rinder (Mittelwert $\pm$ s)

	n	Ocytocin pg/g Naßgewicht
NN- Rinde	10	59 $\pm$ 27
NN- Mark	10	585 $\pm$ 235

Nebennierenmark (NNM) Extrakte enthielten durchschnittlich fast zehnmal so hohe Konzentrationen an Ocytocin wie Nebennierenrinden (NNR) Extrakte.

Der Unterschied zu den nach Gesamtdrüsenextraktion gefundenen Werten läßt sich folgendermaßen erklären: Im ersten Versuch wurde ein Stück der ganzen Nebenniere abgetrennt und der Untersuchung zugeführt. Der NNR-Anteil war vergleichsweise hoch. In Experiment 2 wurde die Nebenniere in Scheiben geschnitten, anschließend NNR und NNM getrennt und die Gewichte der beiden Gewebeanteile bestimmt. Die dabei gefundenen Werte lassen auf ein wesentlich höheres spezifisches Gewicht der Rinde im Vergleich zum Mark schließen. Im Gegensatz zum ersten Versuch wurden bei Experiment 2 die Proben aus dem Mittelteil des Organs entnommen, der NNR-Anteil war relativ niedrig. Zusammengefaßt heißt das also, daß in Versuch 1 der Gewichtsanteil des NNM an der Gesamtprobe niedriger war als in Versuch 2.

Daraus lassen sich die relativ niedrigen Konzentrationen, ermittelt in Versuch 1 erklären.

1.3 Ocytocingehalt in Äthanolextrakten boviner Corpora lutea verschiedener Zyklusstadien

Tab. 5 Ocytocingehalt in Corpora lutea periodica und graviditatis beim Rind (Mittelwert $\pm$ s)

Zyklus-stadium	n	Corp. lut. Naßgew. g	Ocytocin ng/Corp. lut.	Ocytocin ng/g Naßgew.
Tag 1- 4	6	0,82 $\pm$ 0,2	34,0 $\pm$ 30,7	37,8 $\pm$ 26,3
Tag 5- 7	8	2,22 $\pm$ 1,1	286,5 $\pm$ 199,8	139,3 $\pm$ 80,1
Tag 8-13	12	4,65 $\pm$ 1,39	1374,0 $\pm$ 907,7	312,8 $\pm$ 215,5
Tag 14-20	7	3,61 $\pm$ 1,3	244,9 $\pm$ 335,0	51,7 $\pm$ 66,3
Gravidität 3-6. Monat	8	5,21 $\pm$ 1,8	21,2 $\pm$ 28,5	4,4 $\pm$ 5,7

Nicht korrigiert auf Wiederfindung ($\neq$ 70 %)

Corpora lutea (siehe Tab. 5) zeigten in Abhängigkeit vom Zyklusstadium erhebliche Schwankungen hinsichtlich der Ocytocin-Gewebskonzentrationen. Gleichzeitig mit dem Gewichtsanstieg während der Corpus luteum Entwicklung kommt es zu Erhöhung der Gesamtocytocinmenge in diesem Organ. Daß dieser Anstieg nicht nur durch die Größenzunahme bedingt ist, zeigt ein Vergleich der Ocytocinkonzentrationen pro Gramm Naßgewicht. Nach Überschreiten der mittleren Lutealphase sinken die Ocytocinwerte wieder auf das niedrige Niveau des Zyklusanfangs ab. Der Größen- und Gewichtsrückgang erfolgt dagegen wesentlich langsamer.

In Corpora lutea graviditatis wurden die niedrigsten Ocytocinwerte gefunden. Sowohl die Konzentration pro Gewichtseinheit als auch der Absolutgehalt lag im Durchschnitt unter den bei Corpora lutea periodica ermittelten Werten.

2 Ocytocingehalt in der Follikelflüssigkeit nicht
atretischer Follikel verschiedener Größen, sowie
in Zysten beim Rind

Tab. 6 Ocytocinkonzentrationen in der Flüssigkeit nicht
atretischer Follikel und in Zysten beim Rind
(Mittelwert $\pm$ s)

Anzahl der Follikel	Größe in mm Bereich	pg / Follikel	pg /ml Follikel- flüssigkeit
27	4,2 $\pm$ 0,1 (2 - 5)	2,9 $\pm$ 0,2	97,1 $\pm$ 9,1
17	6,6 $\pm$ 0,2 (5 - 8)	4,5 $\pm$ 0,5	41,1 $\pm$ 4,2
8	9,0 $\pm$ 0,2 (8 - 10)	30,0 $\pm$ 14,9	121,0 $\pm$ 54,7
7	16,0 $\pm$ 0,7 (10 - 20)	72,4 $\pm$ 20,6	54,5 $\pm$ 12,9
Zysten 5	37 $\pm$ 10	5436 $\pm$ 3843	190 $\pm$ 78

Mit zunehmender Größe steigt auch der Gesamtocytoicingehalt in der Follikelflüssigkeit (siehe Tabelle 6). Beim Vergleich der pro ml-Gehalte zeigt sich jedoch keine Beziehung zum Follikeldurchmesser. So finden sich bereits in kleinen Follikeln ähnliche Konzentrationen wie sie auch in großen Follikeln vorliegen. Sehr große Mengen an Ocytocin enthielten die untersuchten Zysten.

3 Hormonfreisetzung durch inkubierte bovine Follikel in das Kulturmedium

Tab. 7 Versuch 1: In vitro Ocytocinfreisetzung durch bovine Follikel (Durchmesser 2 - 8 mm) auf Gitternetzen (37°C, 95% O₂, 5% CO₂)
In Spalte 3 ist die am Ende der Inkubation in der Follikelflüssigkeit vorhandene Ocytocin-Konzentration wiedergegeben (Mittelwert $\pm$ s)

n	Ø Größe (mm) (Bereich)	Follikelflkt. pg/Follikel	pg/Follikel / 24h	
			1. Tag	2. Tag
7 *	4.3 $\pm$ 0.7 (2-5)	3.2 $\pm$ 1.2	8.1 $\pm$ 7.8	15.2 $\pm$ 8.6
14	3.7 $\pm$ 0.7 (2-5)	4.3 $\pm$ 2.2	8.1 $\pm$ 3.6	19.2 $\pm$ 16.2
14	6.7 $\pm$ 0.7 (5-8)	5.7 $\pm$ 2.2	9.5 $\pm$ 6.5	9.5 $\pm$ 9.0

* Kultiviert in M199 + BSA

Kleine Follikel (Durchmesser 2 - 8 mm; siehe Tab. 7), die im statischen System inkubiert wurden, setzen bereits geringe Mengen an Ocytocin frei. In zwei der untersuchten Gruppen kam es dabei zu einem deutlichen Anstieg der abgegebenen Menge in den zweiten 24 h der Inkubation. Die Unterschiedliche Zusammensetzung des Inkubationsmediums, dem in einem Fall bovines-Serum-Albumin (BSA), im anderen Fall Serum zugesetzt wurde, scheint keine Auswirkung auf die Ocytocin-freisetzung zu haben.

In einer dritten, ebenfalls mit Serum inkubierten Gruppe von Follikeln blieb die Ausscheidungsrate an den beiden untersuchten Tagen gleich.

Wie diese Versuche zeigten, sind schon kleine Follikel in der Lage, Ocytocin zu sezernieren.

Im nächsten Experiment wurde der Einfluß des Inkubationssystems untersucht.

Tab. 8 Versuch 2: In vitro Hormonfreisetzung durch bovine Follikel im "Continuous-Flux-System"
(Mittelwert $\pm$ s)

Durchmesser (mm) n=16	Progesteron Produktion pmol/mg Protein		Ocytocin Produktion pg/Inkubationsmedium (30ml)	
	24h	48h	24h	48h
11 $\pm$ 3.1	69,6 $\pm$ 27.1	154,5 $\pm$ 42.6	1836 $\pm$ 248	3227 $\pm$ 2417

Während, wie bereits erwähnt, in der ersten Versuchsreihe eine statische Anordnung für die Inkubation gewählt wurde, bei der die Follikel auf Gitternetzen im Medium liegen, wurde in den folgenden Versuchen das sogenannte "Continuous-Flux-System" angewendet. Dabei werden die Follikel ständig von Medium umspült. In diesen Experimenten enthielt die Nährlösung im allen Fällen Serum. In Vergleich zu den ersten Versuchen zeigte sich eine wesentliche Steigerung der Ocytoinfreisetzung durch die Follikel (Faktor 100). Die freigesetzte Menge an Ocytocin hatte sich am zweiten Tag der Inkubation im Vergleich zum ersten Tag in etwa verdoppelt.

Die ebenfalls sehr hohen und ansteigenden Progesteronkonzentrationen lassen den Schluß zu, daß die Follikel in dieser Versuchsanordnung luteinisieren.

Die sich stellende Frage, welche der beiden Zellarten des Follikels, Granulosa- und Thekazellen, verantwortlich für die Ausschüttung von Ocytocin ist, wurde in einem weiteren Experiment untersucht. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 9 a und b ersichtlich.

Tab. 9a Versuch 3: Hormonfreisetzung pro mg Protein durch inkubierte Granulosa- und Thekazellen boviner Follikel während verschiedener Inkubationszeiten (Mittelwert $\pm$ s)

n=12		Inkubationszeit (h)		
		3	24	40
Granulosa Zellen	Ocytocin pg	55 $\pm$ 17	197 $\pm$ 72	685 $\pm$ 231
	Progesteron ng	61 $\pm$ 9	600 $\pm$ 107	3758 $\pm$ 910
Theka Zellen	Ocytocin pg	2,6 $\pm$ 0,5	9,8 $\pm$ 1,6	46 $\pm$ 8,4
	Progesteron ng	22 $\pm$ 6,8	299 $\pm$ 104	1972 $\pm$ 550

Tab. 9b Versuch 3: Hormonfreisetzung, umgerechnet auf den absoluten Proteingehalt der jeweiligen Zellart im Follikel, durch inkubierte Granulosa- und Thekazellen boviner Follikel während verschiedener Inkubationszeiten (Mittelwert $\pm$ s)

n=12		Inkubationszeit (h)		
		3	24	40
Granulosa Zellen	Ocytocin pg	21 $\pm$ 4	96 $\pm$ 34	334 $\pm$ 115
	Progesteron ng	59 $\pm$ 11	528 $\pm$ 113	3563 $\pm$ 1126
Theka Zellen	Ocytocin pg	3,3 $\pm$ 0,7	13,6 $\pm$ 2	77 $\pm$ 22
	Progesteron ng	24 $\pm$ 6	312 $\pm$ 93	2180 $\pm$ 495

Auch in diesem Versuch kam es zu einem deutlichen Anstieg der Progesteronkonzentrationen mit Zunahme der Inkubationsdauer. Dies deutet darauf hin, daß auch hier eine Luteinisierung stattgefunden hat. Es kam dabei nicht zu einem wesentlichen Unterschied in der freigesetzten Progesteronmenge im Vergleich der beiden Zellarten. Es kann also angenommen werden, daß sowohl Granulosa- als auch Thekazellen in der Lage sind Progesteron zu produzieren.

Ein anderes Bild bot sich bei der Ocytocinfreisetzung.

Tab. 10 Verlauf der Hormonfreisetzung durch inkubierte Granulosa- und Thekazellen boviner Follikel, ausgedrückt als das Vielfache des nach dreistündiger Inkubationsdauer vorliegenden Wertes.

		Inkubationszeit (h)			
			3	24	40
Granulosa Zellen	Erhöhung pro mg Protein	OT	1	3.6	12.5
		Prog.	1	9.8	61.6
	Erhöhung pro Gesamt- proteinant.	OT	1	4.6	15.6
		Prog.	1	8.9	60.4
Theka Zellen	Erhöhung pro mg Protein	OT	1	3.8	17.7
		Prog.	1	13.6	89.6
	Erhöhung pro Gesamt- proteinant.	OT	1	4.1	21.5
		Prog.	1	13.0	90.8

Zwar ist für beide Zellpopulationen, wie Tab. 10 zeigt, die relative Zunahme des im Medium akkumulierten Ocytocins vergleichbar, von der absoluten Höhe her jedoch ergeben sich erhebliche Differenzen. Auf pro mg Protein bezogen beträgt die Ocytocinfreisetzung der Granulosazellen in etwa das 15-fache derjenigen der Thekazellen.

Es scheinen also die Granulosazellen der Hauptlieferant follikulären Ocytocins zu sein. Ob man auch die Thekazellen zu den ocytocinabgebenden Zellen rechnen kann ist aus diesem Versuch nicht zu klären. Denkbar ist auch, daß die in den Thekazell-Proben gefundenen Ocytocinmengen durch bei der Präparation nicht ganz abgelöste Granulosazellen verursacht wurden. Der Verlauf der Veränderungen scheint in beiden Versuchsgruppen den gleichen Mechanismen unterworfen zu sein. Der relative Anstieg der Ocytocinfreisetzung ist für beide Zellarten ähnlich (Tab. 10). Aus diesem Grunde könnte also das gleich Prinzip, nämlich die Freisetzung von Ocytocin aus Granulosazellen, für die Veränderungen verantwortlich sein.

Tab. 11 Ocyticingehalt in der Follikelflüssigkeit der in Versuch 3 verwendeten Follikel (Mittelwert $\pm$ s)

n	pg / ml	pg / Foll.
12	$22 \pm 6,3$	$12,3 \pm 3,1$

Bei dem eben besprochenen Versuch wurde vor Beginn der Inkubation von jedem Follikel die Follikelflüssigkeit gewonnen. Die dabei gefundenen Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefaßt dargestellt. Es zeigt sich, daß vor der Inkubation relativ geringe Mengen Ocytocin an die Follikelflüssigkeit abgegeben wurden. Es besteht außerdem ein enormer Unterschied zwischen diesen Ocytocinkonzentrationen und den im Inkubationsversuch im Verlauf der Zeit von den Granulosazellen abgegebenen Mengen.

Diese Versuche zeigten also, daß bereits der Follikel ein Ort der Ocytocinfreisetzung und wie die hohen Werte vermuten lassen, auch der Synthese ist. Den größten, wenn nicht sogar den gesamten Anteil an dieser Abgabe tragen dabei die Granulosazellen. Eine Voraussetzung für diese Fähigkeit zur Ocytocinfreisetzung ist vermutlich die Luteinisierung der Zellen, die durch Inkubation im serumhaltigen Medium verursacht wird. Auch die Verbringung der Follikel in ein System mit ständigem Mediumfluß scheint eine Luteinisierung bewirken zu können.

Nachdem gezeigt wurde, daß bereits in luteinisierten Follikeln die Fähigkeit, relativ große Ocytocinmengen freizusetzen, enthalten ist, werden im folgenden Abschnitt die Ergebnisse der Versuche mit Gelbkörpergewebe bzw. -zellen und deren Fähigkeit Ocytocin freizusetzen besprochen.

Zwei verschiedene Systeme zur Untersuchung des Hormonfreisetzungsverhaltens durch Corpus luteum Gewebe wurden verwendet.

Im ersten Abschnitt werden die mit Corpus luteum Gewebestücken erzielten Ergebnisse besprochen.

Der zweite Teil befaßt sich mit den nach Inkubation von Corpus luteum Zellen erhaltenen Resultaten.

Unter anderem sollte geprüft werden, ob die im gewissen Maße erhaltene Gewebsintegrität bei Gewebestücken von Bedeutung für die Reaktion von Corpus luteum Gewebe auf verschiedene Zusätze ist.

4 Ergebnisse der Inkubationsversuche mit Corpus luteum Gewebestücken

Für die Erstellung eines funktionsfähigen in vitro-Systems mit Gewebestücken war es notwendig, einen Parameter zu finden, der den Beweis liefert, daß die inkubierten Proben in der Lage sind, auf Zusätze zu reagieren. Es bot sich dabei die aus der Literatur gut bekannte stimulierende Wirkung von hCG auf die Progesteronproduktion durch Corpus luteum Gewebe an.

In einer vorausgehenden Testreihe wurde eine günstige Zeitdauer für die Durchführung der Experimente gesucht. Die Steigerung der Progesteronsynthese durch Zusatz von hCG wurde als Kriterium der Zuverlässigkeit verwendet.

Es sei noch einmal darauf hingewiesen, daß nur an das Medium abgegebenes Hormon analysiert wurde, im Gewebe enthaltene Mengen wurden nicht untersucht.

4.1 Einfluß der Inkubationsdauer

Tab. 12 In vitro Hormonfreisetzung (Mittelwert $\pm$ s) durch Corpus luteum Gewebestücke während verschiedener Inkubationszeiten (Versuch 1) mit und ohne Zusatz von hCG (Alter des Corpus luteum: Tag 8 - 9)

Freisetzung / mg Naßgewicht	Zeit (h)	2	4	22	24
Ocytocin ng	—	$0,40 \pm 0,14$	$0,98 \pm 0,17$	$3,46 \pm 0,47$	$3,56 \pm 0,61$
	hCG*	$0,85 \pm 0,12$	$0,68 \pm 0,01$	$3,09 \pm 0,69$	$2,47 \pm 0,45$
Progesteron ng	—	68 ± 6	85 ± 10	113 ± 14	179 ± 24
	hCG*	107 ± 17	142 ± 29	631 ± 153	721 ± 51

* 15 I.E. / ml

Tab. 13 In vitro Hormonfreisetzung (Mittelwert $\pm$ s) durch Corpus luteum Gewebestücke während verschiedener Inkubationszeiten (Versuch 2) mit und ohne Zusatz von hCG (Alter des Corpus luteum: Tag 8 - 9)

Freisetzung / mg Naßgewicht	Zeit (h)	3	4	6	22
Ocytocin ng	—	$0,39 \pm 0,07$	$0,72 \pm 0,20$	$1,25 \pm 0,38$	$3,38 \pm 0,78$
	hCG *	$0,63 \pm 0,16$	$0,69 \pm 0,22$	$0,99 \pm 0,21$	$3,53 \pm 0,40$
Progesteron ng	—	62 ± 12	93 ± 23	99 ± 28	110 ± 19
	hCG *	106 ± 18	125 ± 47	186 ± 32	573 ± 274

* 15 I.E. / ml

In zwei ähnlich durchgeführten Versuchen (wiedergegeben in Tab. 12 und 13) ergab sich dabei folgendes Bild: Progesteron wird über die Dauer der Inkubationszeit mehr oder weniger kontinuierlich abgegeben. Daraus ergibt sich eine ständig steigende Konzentration in der Nährlösung mit Zunahme der Inkubationsdauer. Nach 22 und 24 h Inkubationsdauer war noch kein Plateau der Progesteronakkumulation erreicht. Eine Produkthemmung scheint also bis zu diesem Zeitpunkt nicht aufzutreten.

Die Progesteronabgabe an das Medium wird durch Zusatz von hCG gesteigert. Dieser Effekt tritt bereits bei kurzen Inkubationszeiten auf, durch eine Verlängerung der Inkubationsdauer konnte eine nochmalige Steigerung dieser Wirkung hervorgerufen werden.

Ocytocin zeigt in unbehandelten Proben ein dem Progesteron ähnliches Verhalten. Mit zunehmender Inkubationsdauer steigt die Höhe der im Medium gefundenen Konzentration.

Nach Zusatz von hCG scheint bei kurzen Inkubationszeiten (3 h) eine Stimulation der Oxytocinabgabe zu erfolgen. Mit Fortschreiten der Inkubationsdauer ist jedoch eher ein hemmender Einfluß von hCG zu beobachten.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde für alle weiteren Versuche eine 18 oder 24 h Inkubation (über Nacht) als praktikable Lösung durchgeführt.

4.2 Einfluß des Alters (Zyklusstand) des Corpus luteum

Tab. 14 In vitro Hormonfreisetzung (Mittelwert $\pm$ s) in 24 h durch Corpus luteum Gewebestücke von Corpora lutea verschiedenen Alters mit und ohne Zusatz von hCG (Corpus luteum Nr. 1: Tag 7 - 8; Corpus luteum Nr. 2: Tag 13 - 14)

Zyklustag	7 - 8		13 - 14	
hCG I.E.	—	30	—	30
Oxytocin ng / mg Naßgewicht	$2,88 \pm 0,73$	$4,12 \pm 0,70$	$3,00 \pm 1,02$	$2,10 \pm 0,53$
Progesteron ng / mg Naßgewicht	804 ± 118	1366 ± 141	204 ± 67	562 ± 207

Es ist problematisch, bei den von Tier zu Tier möglichen, großen individuellen Schwankungen die absoluten freigesetzten Hormonmengen in einem derartigen Versuch zu interpretieren. Ein Vergleich der relativen Veränderungen jedoch dürfte zuverlässige Hinweise auf eventuell unterschiedliches Verhalten der beiden untersuchten Corpora lutea liefern.

Es zeigte sich, daß in diesem Falle von beiden Corpora lutea, pro mg Gewebe, in etwa die gleiche Menge an Ocytocin freigesetzt wurde.

Bei Corpus luteum Nr. 1 (Tag 7 - 8) war nach Zugabe von hCG eine deutliche Erhöhung der Ocytocinabgabe zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu scheint der gleiche Zusatz bei Corpus luteum Nr. 2 (Tag 13 - 14) eine Hemmung der Ocytocinausscheidung zu bewirken.

Corpus luteum Nr.1 setzte bereits unstimuliert große Mengen an Progesteron frei. Der Zusatz von hCG konnte die Abgabe auf den gut eineinhalbfachen Wert steigern. Corpus luteum Nr. 2 setzte unstimuliert deutlich weniger Progesteron frei, reagierte aber auf hCG-Stimulation mit einer fast zweieinhalbfachen Mehrabgabe.

HCG könnte also in dem Corpus luteum der frühen Lutealphase eine Stimulierung, in dem Corpus luteum der späten Lutealphase eher eine Hemmung der Ocytocinfreisetzung bewirkt haben.

Das ältere Corpus luteum reagiert mit einer deutlicheren Steigerung der Progesteronabgabe auf hCG-Zusatz als das jüngere Corpus luteum.

Durch die Vorversuche wurde ein funktionsfähiges Modell für die in vitro Inkubation von Corpus luteum Gewebestücken etabliert.

Damit wurden nun eine Reihe von Hormonen, von denen bekannt ist, daß sie in vivo und/oder in vitro einen Einfluß auf das Ovar ausüben, untersucht.

4.3 Einfluß von FSH (NIH-S6)

Tab. 15 Vers. 1: In vitro Hormonfreisetzung (Mittelwert $\pm$ s)
durch Corpus luteum Gewebestücke in 18 h
nach Zusatz von FSH (NIH-S6)
Alter des Corpus luteum: Tag 11 - 12

	—	hCG	F S H			
			5 ng/ml	10 ng/ml	15 ng/ml	30 ng/ml
Ocytocin ng/mg Naßgewicht	$0,93 \pm 0,15$	$0,95 \pm 0,20$	$1,24 \pm 0,18$	$1,09 \pm 0,18$	$1,02 \pm 0,12$	$0,98 \pm 0,23$
Progesteron ng/ml Naßgewicht	234 ± 19	377 ± 37	381 ± 106	425 ± 72	378 ± 56	426 ± 58

Tab. 16 Vers. 2: In vitro Hormonfreisetzung (Mittelwert $\pm$ s)
durch Corpus luteum Gewebestücke in 24 h
nach Zusatz von FSH (NIH-S6)
Alter des Corpus luteum: Tag 9 - 10

	—	hCG 30 I.E./ml	F S H		
			15 ng/ml	30 ng/ml	45 ng/ml
Ocytocin ng/mg Naßgewicht	$2,52 \pm 0,36$	$2,04 \pm 0,31$	$2,22 \pm 0,23$	$2,45 \pm 0,36$	$2,76 \pm 0,25$
Progesteron ng/mg Naßgewicht	180 ± 38	607 ± 119	513 ± 81	422 ± 55	461 ± 29

Zuerst galt das Interesse dem Follikel-stimulierenden-Hormon (FSH). Es wird vermutet, daß Ocytocin in Verbindung mit PGF_{2α} maßgeblich am Ingangkommen der Luteolyse beteiligt ist. Aus diesem Grunde ist es nicht ausgeschlossen, daß Gonadotropine auch auf die Ocytocinabgabe eine Wirkung ausüben.

In Versuch 1 (Tab. 15; Corpus luteum Tag 11 - 12) zeigt sich keine deutliche Veränderung des Ocytocinfreisetzungsverhaltens durch Zusatz von FSH (NIH - S6).

Auch in Experiment 2 (Tab. 16) waren die Ocytocinwerte der behandelten Proben vergleichbar mit denen der Kontrollen. Es zeigte sich hier jedoch die Tendenz, daß mit steigender FSH-Konzentration auch die im Medium akkumulierte Ocytocinmenge zunimmt.

In einem weiteren hier nicht aufgeführten Versuch mit einem Corpus luteum der mittleren Lutealphase (Tag 8 - 9) wurde bei einer Dosis von 60 ng FSH/ml ein Anstieg der Durchschnittskonzentration um ca. 50 % im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet.

In beiden Versuchen war eine nicht dosisabhängige Steigerung der Progesteronfreisetzung durch den FSH-Zusatz zu sehen. Möglicherweise ist dieser Effekt jedoch auf den in diesem Präparat enthaltenen LH-Anteil zurückzuführen. Zu untersuchen ist, ob reine FSH-Präparationen immer noch diese Wirkung zeigen.

4.4 Einfluß von Östradiol-17 β (E₂-17 β)

Tab. 17 Vers. 1: In vitro Hormonfreisetzung (Mittelwert $\pm$ s)
durch Corpus luteum Gewebestücke in 18 h
nach Zusatz von Östradiol-17 β
Alter des Corpus luteum: Tag 7 - 8

	—	hCG	Östradiol-17 β (pg/ml)			
		30 I.E./ml	0,27	2,7	27	270
Ocytocin ng/mg Naßgewicht	6,03 $\pm$ 0,43	5,00 $\pm$ 0,31	5,11 $\pm$ 0,67	3,78 $\pm$ 0,69	5,17 $\pm$ 0,81	3,75 $\pm$ 1,28
Progesteron ng/mg Naßgewicht	559 $\pm$ 183	843 $\pm$ 63	686 $\pm$ 91	591 $\pm$ 38	736 $\pm$ 75	560 $\pm$ 101

Tab. 18 Vers. 2: In vitro Hormonfreisetzung (Mittelwert $\pm$ s)
durch Corpus luteum Gewebestücke in 24 h
nach Zusatz von Östradiol-17 β
Alter des Corpus luteum: Tag 11 - 12

	—	hCG	Östradiol-17 β (ng/ml)		
		30 I.E./ml	27	270	2700
Ocytocin ng/mg Naßgewicht	1,05 $\pm$ 0,17	1,22 $\pm$ 0,13	1,21 $\pm$ 0,12	1,58 $\pm$ 0,28	1,33 $\pm$ 0,21
Progesteron ng/mg Naßgewicht	133 $\pm$ 30	230 $\pm$ 45	172 $\pm$ 24	118 $\pm$ 26	114 $\pm$ 27

Ausgehend von der im vorhergehenden Versuch angestellten Vermutung, daß FSH eine stimulierende Wirkung auf die Corpus luteum Ocytocinfreisetzung haben könnte, wurde die Wirkung von Östradiol-17 β auf die Ocytocinabgabe untersucht.

Auch in diesem Fall wird das Problem der großen Standardabweichungen, die sich vor allem bei der Analyse der Ocytocin-gehalte zeigten, deutlich. Alle im folgenden angestellten Betrachtungen können daher nur Vermutungen sein.

Es zeigten sich je nach Dosierung unterschiedliche Wirkungen von $E_2-17\beta$. In niedrigen Dosen (pg-Bereich) war eine eher hemmende Wirkung auf die Ocytocinabgabe zu verzeichnen. Durch die Dosis von 2.7 und 270 pg $E_2-17\beta$ wurde die Ocytocinausschüttung im Vergleich zu den Kontrollgruppen um durchschnittlich 40 % reduziert. Diese Versuche wurden mit Gewebestücken aus einem Corpus luteum (Tag 7 - 8) der frühen Lutealphase durchgeführt. Bei dem in Versuch 2 verwendeten Corpus luteum (Tag 11 - 12) der mittleren Lutealphase zeigte sich ein völlig anderes Verhalten nach Zugabe von $E_2-17\beta$. In diesem Versuch wurden allerdings wesentlich höhere Dosen verwendet (ng - ug Bereich). In allen untersuchten Fällen lag die mittlere Konzentration über der der Kontrollgruppe. Die Dosis von 270 ng/ml steigerte die Ocytocinfreisetzung gegenüber der Null-Kontrolle um ca. 50 %.

4.5 Einfluß von Indomethazin, Prostaglandinen, sowie dem PGF₂ -Analog Cloprostenol (Versuch 1 - 4)

Bei in vivo Versuchen wurde gezeigt, daß Cloprostenol Applikation eine erhebliche Veränderung der Ocytocin und Progesteronwerte nach sich zog (SCHAMS & KARG, 1982). Inwieweit eine Entsprechung dazu sich im in vitro Modell zeigt, wurde in diesem Experiment untersucht.

Tab. 19 Vers. 1: In vitro Hormonfreisetzung (Mittelwert $\pm$ s) durch Corpus luteum Gewebestücke in 18 h nach Zusatz von Cloprostenol

	—	hCG	Cloprostenol (ng/ml)		
		30 I.E./ml	25	250	2500
Ocytocin ng/mg Naßgewicht	0,93 $\pm$ 0,15	0,95 $\pm$ 0,20	0,85 $\pm$ 0,24	0,80 $\pm$ 0,12	0,70 $\pm$ 0,19
Progesteron ng/mg Naßgewicht	234 $\pm$ 19	377 $\pm$ 37	270 $\pm$ 36	246 $\pm$ 36	266 $\pm$ 47

Die Ocytocinakkumulation im Medium wurde durch Cloprostenol nicht wesentlich verändert.

Auch auf die in vitro Progesteronfreisetzung scheint Cloprostenol in den untersuchten Konzentrationen keinen Einfluß zu haben.

Die Analyse von PGF_{2 α} , die für diesen Versuch nachträglich durchgeführt wurde, ergab sehr hohe Konzentrationen nach Applikation von Cloprostenol. Die gefundenen Werte zeigten dabei Dosisabhängigkeit. Da die Möglichkeit einer Kreuzreaktion von Cloprostenol noch nicht untersucht wurde, werden die Ergebnisse hier nicht dargestellt.

Tab. 20 Vers. 2: In vitro Hormonfreisetzung (Mittelwert $\pm$ s)
 durch Corpus luteum Gewebestücke während
 verschiedener Inkubationszeiten nach Zusatz
 von hCG und oder Indomethazin (Alter des
 Corpus luteum Tag 10 - 11)

Freisetzung / mg Naßgew.	Zeit (h)	—	hCG 30 I.E. / ml	Indo- methazin 100 μ g / ml	hCG + Indom.
Ocytocin ng	4	0,43 $\pm$ 0,14	0,50 $\pm$ 0,03	0,37 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,03
	8	0,48 $\pm$ 0,06	0,61 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,12	0,52 $\pm$ 0,08
	16	1,04 $\pm$ 0,10	0,71 $\pm$ 0,06	0,76 $\pm$ 0,08	0,73 $\pm$ 0,01
	24	0,93 $\pm$ 0,05	0,70 $\pm$ 0,11	1,04 $\pm$ 0,16	1,07 $\pm$ 0,15
Progesteron ng	4	84 $\pm$ 19	104 $\pm$ 6	109 $\pm$ 19	129 $\pm$ 2
	8	165 $\pm$ 1	219 $\pm$ 28	154 $\pm$ 37	243 $\pm$ 37
	16	248 $\pm$ 40	343 $\pm$ 43	241 $\pm$ 17	303 $\pm$ 19
	24	319 $\pm$ 45	415 $\pm$ 24	259 $\pm$ 47	455 $\pm$ 40
PGF ₂ α fmol	4	66 $\pm$ 7	116 $\pm$ 17	10 $\pm$ 4	6 $\pm$ 4
	8	1130 $\pm$ 128	1070 $\pm$ 94	14 $\pm$ 5	15 $\pm$ 4
	16	3220 $\pm$ 493	2151 $\pm$ 945	5 $\pm$ 3	3 $\pm$ 4
	24	5340 $\pm$ 1250	7010 $\pm$ 890	18 $\pm$ 12	11 $\pm$ 8

In den nächsten Versuchen wurde der in vivo bekannte Einfluß von Prostaglandinen auf die Ocytocinfreisetzung untersucht. Dabei wurden die Prostaglandine allein oder in Kombination mit dem Prostaglandin-Synthetasehemmer Indomethazin zugesetzt. Um einen Effekt, der allein durch den Zusatz von Indomethazin hervorgerufen wird, ausschließen zu können, wurde dieser Stoff in einem Vorversuch untersucht. Dabei wurde Indomethazin allein oder in Kombination mit hCG zugesetzt (Tab. 20)

In diesem Experiment wurde ein Ansteigen der Ocytocinkonzentrationen bis zur 16 h Inkubation beobachtet. In der 24 h Probe erfolgte kein weiterer Anstieg mehr.

Während bei kurzen Inkubationszeiten (4 und 8 Stunden) ein eher fördernder Effekt von hCG auf die Ocytocinfreisetzung zu verzeichnen ist, ist bei langen Inkubationszeiten ein mehr hemmender Einfluß zu beobachten. Indomethazin hatte keine Wirkung auf die Ocytocinfreisetzung.

In diesem Versuch wurde möglicherweise die oberste Kapazität der Corpus luteum Gewebestücke erreicht. Das Fehlen eines weiteren Anstiegs der Ocytocinkonzentration von 16 h auf 18 h Inkubationsdauer läßt in diesem Falle entweder auf eine Hemmung der Synthese oder aber auf ein Sistieren der Ocytocinabgabe schließen.

Die Progesteronfreisetzung wurde durch Indomethazin weder in den unstimulierten noch in den mit hCG stimulierten Proben beeinflusst.

Mit zunehmender Inkubationsdauer steigt die in das Medium abgegebene Menge an $\text{PGF}_{2\alpha}$ erheblich an. Bedingt durch die auftretenden hohen Schwankungen der Werte in den einzelnen Gruppen kann auf einen Einfluß von hCG auf die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Freisetzung nicht geschlossen werden. Durch Indomethazin allein oder in Kombination wurde die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Abgabe praktisch verhindert.

Dieser Versuch zeigt, daß das Corpus luteum Gewebestück in der Lage ist, $\text{PGF}_{2\alpha}$ zu produzieren. Durch den Cyclooxygenasehemmer Indomethazin wurde die Synthese neuen $\text{PGF}_{2\alpha\text{S}}$ verhindert. Da diese Hemmung bereits auf der Vorstufe aller Prostaglandine wirkt (Umwandlung von Arachidonsäure zu PGG_2) ist eine Neusynthese vermutlich auch für andere Prostaglandine unterbunden. Da Prostaglandine im Säugetierorganismus nicht gespeichert werden (HOPPEN, 1982) und auch für das Corpus luteum bisher nichts Gegenteiliges bekannt ist, kann angenommen werden, daß durch den Indomethazinzusatz die Freisetzung aller Prostaglandine verhindert wird. Das Modell scheint also geeignet, die Wirkung einzelner Prostaglandine zu untersuchen.

Tab. 21 Vers. 3: In vitro Hormonfreisetzung (Mittelwert $\pm$ s) durch Corpus luteum Gewebestücke nach Zusatz von PGI_2^* und/oder Indomethazin

Freisetzung / mg Naßgewicht	—	hCG	Indo- methazin	PGI_2		$\text{PGI}_2 + \text{Indom. (100}\mu\text{g)}$	
		30 I.E./ml	100 $\mu\text{g/ml}$	100 ng/ml	1 $\mu\text{g/ml}$	100 ng/ml	1 $\mu\text{g/ml}$
Oxytocin ng	1,15 $\pm$ 0,15	1,37 $\pm$ 0,15	1,12 $\pm$ 0,15	1,08 $\pm$ 0,21	1,11 $\pm$ 0,04	1,36 $\pm$ 0,20	1,09 $\pm$ 0,31
Progesteron ng	511 $\pm$ 53	732 $\pm$ 96	635 $\pm$ 91	780 $\pm$ 44	867 $\pm$ 112	534 $\pm$ 80	634 $\pm$ 138
$\text{PGF}_{2\alpha}$ fmol	6990 $\pm$ 2110	8090 $\pm$ 1760	33 $\pm$ 7	5710 $\pm$ 2080	5490 $\pm$ 730	32 $\pm$ 3	27 $\pm$ 3

* Iloprost^R

Die im folgenden Abschnitt besprochenen Ergebnisse sind in Tab. 21 zusammengefaßt.

Ocytocin blieb in diesen Versuchen im Wesentlichen von allen verwendeten Zusätzen unbeeinflußt. Lediglich nach Zugabe von hCG und von PGI_2 (100 $\mu\text{g/ml}$) in Verbindung mit Indomethazin scheint eine leichte Erhöhung der Ocytocinfreisetzung zu erfolgen.

Eine dosisabhängige Erhöhung durch PGI_2 konnte bei der Progesteronabgabe beobachtet werden. Auch der Zusatz von Indomethazin allein führte in diesem Versuch zu einer Erhöhung der Progesteronkonzentration im Medium. Wird zusätzlich zu PGI_2 Indomethazin mitinkubiert, so verschwindet der stimulierende Einfluß wieder oder wird zumindest stark vermindert. Dies deutet darauf hin, daß die Wirkung von PGI_2 an das Vorhandensein anderer Prostaglandine gebunden ist.

$\text{PGF}_{2\alpha}$ wird durch PGI_2 nicht beeinflusst. Durch Zusatz von Indomethazin konnte dessen Freisetzung praktisch verhindert werden. HCG hatte einen die Freisetzung eher fördernden Effekt.

Tab. 22 Vers. 4: In vitro Hormonfreisetzung (Mittelwert $\pm$ s)
 durch Corpus luteum Gewebestücke in 24 h
 nach Zusatz von PGE₂ und oder Indo-
 methazin (Alter des Corpus luteum Tag
 10 - 11)

Freisetzung/ mg		hCG	Indo- methazin	PGE ₂		PGE ₂ + Jndom. (100ng/ml)		
Naßgewicht	—	30 I.E./ml	100 ng/ml	100 ng/ml	1 ng/ml	100 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml
Ocytocin ng	0,92 $\pm$ 0,06	1,01 $\pm$ 0,13	0,99 $\pm$ 0,24	0,83 $\pm$ 0,18	1,10 $\pm$ 0,15	1,18 $\pm$ 0,06	1,00 $\pm$ 0,18	0,89 $\pm$ 0,12
Progesteron ng	323 $\pm$ 63	970 $\pm$ 92	523 $\pm$ 38	674 $\pm$ 160	514 $\pm$ 76	570 $\pm$ 123	755 $\pm$ 31	705 $\pm$ 191
PGF ₂ α fmol	3540 $\pm$ 150	5830 $\pm$ 1200	12 $\pm$ 10	4480 $\pm$ 1880	7540 $\pm$ 2710	170 $\pm$ 20	934 $\pm$ 46	3887 $\pm$ 350

Die in Versuch 4 gefundenen Ergebnisse sind in Tab. 22 dargestellt

In Versuch 4 wurde die Ocytocinabgabe an das Medium durch das zugesetzte PGE₂ nicht verändert.

Wie PGI₂ im vorhergehenden Experiment, so steigerte auch PGE₂ in dieser Untersuchung die Progesteronabgabe durch die Gewebestücke. Im Gegensatz dazu wird der stimulierende Effekt hier durch zusätzliche Indomethazingabe deutlicher. Auch in diesem Versuch genügte allein die Zugabe von Indomethazin, um die Progesteronfreisetzung zu fördern.

HCG scheint die PGF₂ α -Freisetzung zu erhöhen.

Auch nach PGE₂-Zusatz zeigt sich eine deutliche, dosisabhängige Erhöhung der PGF₂ α -Konzentration im Medium. Setzt man PGE₂ in Kombination mit Indomethazin zu, so ist dennoch eine dosisabhängige Steigerung der PGF₂ α -Akkumulation im Medium zu beobachten.

Eine Kreuzreaktion des verwendeten $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Antikörpers mit dem zugesetzten PGE_2 ist nach von ENZENHÖFER (1984) durchgeführten Untersuchungen dabei auszuschließen. Es muß also angenommen werden, daß das Corpus luteum Gewebe in der Lage ist, PGE_2 in $\text{PGF}_{2\alpha}$ umzuwandeln. Daß dies auch geschieht, wenn die Prostaglandinproduktion nicht gehemmt ist, zeigen die bei alleinigem Zusatz von PGE_2 auftretenden Veränderungen der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentration.

4.6 Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen 4.1 - 4.5

Wie die vorhergehenden Versuche zeigten, wird von Corpus luteum Gewebestücken im in vitro System Ocytocin freigesetzt. Diese Freisetzung scheint zumindest in den ersten 24 Stunden zu einer kontinuierlichen Erhöhung der im Inkubationsmedium akkumulierten Ocytocinmenge zu führen. Möglicherweise spielt das Alter des Corpus luteum, von dem die Proben gewonnen wurden, eine Rolle. So wird von jüngeren Corpora lutea (Tag 7 - 9) in der Regel mehr Ocytocin freigesetzt, als von älteren (Tag 10 - 14)

Ein Reihe von Substanzen zeigt eine Beeinflussung der Ocytocinfreisetzung durch das Corpus luteum. Ein stimulierender Einfluß wurde gefunden nach FSH, E_2 -17 β (ng - μ g Bereich) und vor allem bei jüngeren Corpora lutea und kurzen Inkubationszeiten durch hCG-Zusatz. Bei älteren Gelbkörpern und längeren Inkubationszeiten, führte hCG in der Regel zu einer Abnahme der Ocytocinkonzentration im Medium. In niedrigen Konzentrationen (pg Bereich) hatte Östradiol einen hemmenden Effekt auf die Ocytocinabgabe.

Um einige Nachteile der Inkubation mit Gewebestücken zu vermeiden, aber auch um, wie bereits oben erwähnt, systembedingte Unterschiede zu erfassen, wurde nun auf Inkubation von Corpus luteum Zellen übergegangen.

Die Einführung dieses Systems bietet einige Vorteile gegenüber der Inkubation mit Gewebestücken. So ist die verwendete Probe homogener, die Unterschiede zwischen den Parallelproben sind geringer. Dies führt zu einer kleineren Standardabweichung und damit besseren Vergleichbarkeit einzelner Gruppen. Ein weiterer Vorteil ist, daß mit größeren Probenzahlen gearbeitet werden kann, was die gleichzeitige Auswertung mehrerer Substanzen an den Zellen eines Corpus luteum erlaubt. Auch gewährleistet die Zellsuspension, daß alle Zellen gleichermaßen von der Stimulierung durch ein zugesetztes Hormon erfaßt werden. Dies ist eines der größten Probleme bei Verwendung von Gewebestücken, da nicht bekannt ist, wie weit im Inneren des Gewebes liegende Zellen von einem zugesetzten Stoff erreicht werden.

Sicherlich gehen aber durch diese Aufarbeitungsform einige, an die Gewebsintegrität gebundene Funktionen verloren.

5 Ergebnisse der Inkubationsversuche mit Corpus luteum Zellen

Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert aus vier Parallelproben, die jeweils im Doppelansatz bestimmt wurden.

5.1 Einfluß der Inkubationszeit und Zusatz von hCG

Zur Ermittlung einer günstigen Inkubationsdauer wurden auch hier Vorversuche durchgeführt. Dabei wurde zunächst die für die Gewebestücke verwendete über Nacht Inkubation untersucht.

Tab. 23 Vers. 1: In vitro Hormonfreisetzung (Mittelwert $\pm$ s)
durch Corpus luteum Zellen während verschiedener Inkubationszeiten mit und ohne Zusatz von hCG

Freisetzung / 10 ⁵ Zellen	Zeit (h)	—	hCG I.E.	
			1,0	5,0
Ocytocin pg	16	73 $\pm$ 25	100 $\pm$ 23	108 $\pm$ 10
	19	113 $\pm$ 24	107 $\pm$ 23	119 $\pm$ 24
	22	119 $\pm$ 18	135 $\pm$ 24	122 $\pm$ 46
Progesteron ng	16	64 $\pm$ 3	131 $\pm$ 4	101 $\pm$ 5
	19	45 $\pm$ 3	85 $\pm$ 5	73 $\pm$ 2
	22	36 $\pm$ 3	51 $\pm$ 5	41 $\pm$ 4
PGF ₂ α fmol	16	156 $\pm$ 6	201 $\pm$ 7	179 $\pm$ 11
	22	147 $\pm$ 20	160 $\pm$ 49	183 $\pm$ 18

Dabei ergab sich folgendes Bild. In der unbehandelten Probe steigt Ocytocin von der 16 h zur 19 h Inkubation an. Ein weiterer Anstieg durch Verlängerung der Versuchsdauer um 3 Stunden ist nicht mehr zu verzeichnen. Ein die Ocytocinabgabe stimulierender Effekt von hCG in den beiden gewählten Dosen scheint in den 16 h Proben aufzutreten. Bei längerer Inkubationsdauer wird kein Effekt mehr beobachtet. Die in dieser Versuchsanordnung beobachteten Veränderungen der Ocytocinkonzentrationen im Medium waren eher gering, sieht man von der etwas niedrigeren unbehandelten 16 h Probe ab.

Progesteron zeigte ein von den Gewebestücken her ungewohntes Verhalten. Unstimuliert wurden die höchsten Werte bereits nach 16 h Inkubation erreicht, nach 19 und 22 h war jeweils ein Abfall zu verzeichnen. HCG stimulierte die Progesteronabgabe an das Medium. Aber auch hier fällt die Konzentration mit der Dauer der Inkubation ab. In allen drei Fällen war die Wirkung der niedrigen hCG-Dosis (1.0 I.E./ml) besser als die der höheren Dosis (5.0 I.E./ml).

PGF_{2α} in den unbehandelten Proben erfuhr keine Erhöhung durch die Verlängerung der Inkubationsdauer von 16 auf 22h. Zumindest in den 16 h Proben scheint eine stimulierende Wirkung von hCG auf die PGF_{2α}-Abgabe an das Medium vorhanden zu sein.

Die Streuung der Parallelproben war in diesem Versuch vor allem für Progesteron, aber auch für PGF_{2α} gering.

Die größte Varianz der Einzelproben innerhalb einer Gruppe trat bei den Ocytocinwerten auf. Ein ähnliches Verhalten wurde bereits bei den Untersuchungen mit Corpus luteum Gewebestücken beobachtet.

Tab. 24 Vers. 2: In vitro Hormonfreisetzung (Mittelwert $\pm$ s)
 durch Corpus luteum Zellen während ver-
 schiedener Inkubationszeiten mit und ohne
 Zusatz von hCG (Alter des Corpus luteum Tag
 12 - 13)

Freisetzung/ 10 ⁵ Zellen	Zeit (h)	—	hCG I.E.		
			0,1	0,5	1,0
Ocytocin pg	1	18 $\pm$ 12	28 $\pm$ 28	23 $\pm$ 25	33 $\pm$ 23
	2	41 $\pm$ 34	22 $\pm$ 28	31 $\pm$ 46	23 $\pm$ 34
	3	33 $\pm$ 26	51 $\pm$ 26	40 $\pm$ 14	51 $\pm$ 26
	4	28 $\pm$ 15	32 $\pm$ 15	79 $\pm$ 37	59 $\pm$ 24
Progesteron ng	1	5 $\pm$ 3	7 $\pm$ 4	5 $\pm$ 2	7 $\pm$ 1
	2	6 $\pm$ 7	24 $\pm$ 2	20 $\pm$ 4	19 $\pm$ 2
	3	26 $\pm$ 6	69 $\pm$ 2	75 $\pm$ 9	68 $\pm$ 6
	4	58 $\pm$ 4	182 $\pm$ 9	172 $\pm$ 15	182 $\pm$ 22
PGF ₂ α fmol	2	20 $\pm$ 14	23 $\pm$ 10	15 $\pm$ 10	5 $\pm$ 6
	4	55 $\pm$ 6	50 $\pm$ 8	68 $\pm$ 28	60 $\pm$ 20

Vor allem die im vorigen Versuch erzielten Progesteron-Ergebnisse ließen es opportun erscheinen, kürzere Inkubationszeiten zu untersuchen (siehe Tab. 24)

Ocytocin zeigte hier eine noch größere Varianz innerhalb der Einzelproben einer Gruppe als im vorher beschriebenen Versuch. Aus diesem Grund kann auch nicht auf eine eventuelle Wirkung nach Zusatz von hCG geschlossen werden. Die Zellen

in diesem Versuch wurden von einem Corpus luteum (Tag 12 - 13) am Ende der mittleren Lutealphase gewonnen. Bei den Versuchen mit Gewebestücken hatte sich gezeigt, daß zunehmendes Alter des Corpus luteum in der Regel mit niedrigen Ocytocinwerten im Medium verbunden sind. Auch die in diesem Versuch gefundenen Ergebnisse scheinen diese Vermutung zu bestätigen.

Im Gegensatz zu Ocytocin streuten die für Progesteron gefundenen Werte innerhalb einer Gruppe nur sehr wenig. Bereits nach zwei Stunden wird eine deutliche hCG-Stimulierung der Progesteronfreisetzung sichtbar. Der größte Unterschied tritt nach 4-stündiger Versuchsdauer auf. Die Wirkung der einzelnen verwendeten Konzentrationen von hCG war nicht verschieden.

Mit zunehmender Inkubationsdauer erhöhte sich auch die Menge des im Medium gefundenen $\text{PGF}_{2\alpha}$ s. Von den zugesetzten Mengen an hCG ging keine Wirkung auf das Freisetzungsverhalten von $\text{PGF}_{2\alpha}$ durch Corpus luteum Zellen aus.

Auf Grund der guten Nachweismöglichkeit der Stimulierbarkeit der Zellen durch das von Progesteron in diesem Versuch gezeigte Verhalten wurde die 4 stündige Inkubationsdauer in den folgenden Versuchen eingesetzt.

5.2 Einfluß von Steroidhormonen und Gonadotropinen sowie von Ocytocin

Mit den in diesem Kapitel beschriebenen Versuchen sollte der Einfluß von im Ovar selbst synthetisierten (Steroiden) und auf das Ovar einwirkenden (Gonadotropine) Hormonen auf das in vitro Verhalten der Corpus luteum Zellen untersucht werden. Ein Teil dieser Substanzen wurde bereits am Gewebestück untersucht. Es wurde überprüft, inwieweit die dort erhaltenen Ergebnisse übertragbar sind.

Die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden mit Zellen, gewonnen aus einem Corpus luteum (Tag 9 - 10), durchgeführt. Aus diesem Grund sind die Werte für die Kontrollen identisch.

5.2.1 Einfluß von Progesteron

Tab. 25 Vers. 1: In vitro Hormonfreisetzung (Mittelwert $\pm$ s) durch Corpus luteum Zellen in 4 h nach Zusatz von Progesteron.

Freisetzung / 10 ⁵ Zellen		hCG 0,5 I.E./ml	Progesteron (μ g/ml)			
			0,1	1,0	10	100
Ocytocin pg	180 $\pm$ 18	196 $\pm$ 27	191 $\pm$ 32	208 $\pm$ 27	173 $\pm$ 16	183 $\pm$ 37
Progesteron ng	80 $\pm$ 6	167 $\pm$ 18	/	/	/	/
PGF ₂ α fmol	105 $\pm$ 17	96 $\pm$ 11	92 $\pm$ 14	121 $\pm$ 29	127 $\pm$ 18	103 $\pm$ 20

In diesem Versuch wurde untersucht, ob Progesteron daß bereits initial in relativ großen Mengen im Inkubationsmedium vorliegt, einen Einfluß auf die Hormonfreisetzung der Gelbkörperzellen ausüben kann. Dabei sollte vor allem geprüft werden, ob sich eine Wirkung auf die Progesteronabgabe etwa im Sinne einer Produkthemmung zeigt. Die erhaltenen Werte deuten auf einen derartigen Effekt hin, möglicherweise kam es sogar zu einer Erniedrigung der anfänglich vorhandenen Progesteronkonzentrationen. Da dieses Ergebnis jedoch nicht abgesichert ist, wurden die Werte hier nicht aufgenommen. Dieses Verhalten sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die nach 4 h erfolgte Akkumulation von Ocytocin und $\text{PGF}_{2\alpha}$ wurde von den untersuchten Konzentrationen an Progesteron nicht beeinflusst.

5.2.2 Einfluß von Östradiol-17 β (E_2 -17 β)

Tab. 26 Vers. 2: In vitro Hormonfreisetzung (Mittelwert $\pm$ s) durch Corpus luteum Zellen in 4 h nach Zusatz von E_2 -17 β

Freisetzung / 10 ⁵ Zellen		hCG 0,5 I.E./ml	Östradiol - 17 β ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
			0,1	1	10	100
Ocytocin pg	180 $\pm$ 18	196 $\pm$ 27	203 $\pm$ 21	187 $\pm$ 23	178 $\pm$ 38	197 $\pm$ 24
Progesteron ng	80 $\pm$ 6	167 $\pm$ 18	85 $\pm$ 7	68 $\pm$ 4	21 $\pm$ 4	6 $\pm$ 3
$\text{PGF}_{2\alpha}$ fmol	105 $\pm$ 17	96 $\pm$ 11	135 $\pm$ 12	130 $\pm$ 26	69 $\pm$ 3	24 $\pm$ 20

Das bereits bei den vorhergehenden Versuchen mit Corpus luteum Gewebestücken untersuchte E₂-17 β zeigte dort in Abhängigkeit von der Konzentration möglicherweise einen entweder hemmenden oder fördernden Einfluß auf die Ocytocin-freisetzung durch das Corpus luteum.

In den hier verwendeten Konzentrationen, die sicherlich im Vergleich zu den vorher bei Gewebestücken eingesetzten Dosen hoch sind, zeigte sich keine Wirkung auf die Ocytocinabgabe durch Corpus luteum Zellen.

Anders verhielt sich Progesteron. Mit zunehmender Konzentration von E₂-17 β kam es schließlich zum Erliegen der Progesteronfreisetzung durch Corpus luteum Zellen.

Ein ähnlicher Effekt konnte auch bei PGF₂ α beobachtet werden. Die höchste eingesetzte Konzentration von E₂-17 β führte zu einer Reduktion der PGF₂ -Ausschüttung auf weniger als 1/4 des in der Kontrollgruppe gefundenen Wertes. Möglicherweise wird durch E₂-17 β ein bei der Abgabe beider Hormone beteiligter Mechanismus beeinflusst. Die Ausschüttung, bzw. deren Hemmung scheint für die beiden letztgenannten Hormone gekoppelt.

5.2.3 Einfluß von LH (NIH - B8)

Tab. 27 Vers. 3: In vitro Hormonfreisetzung (Mittelwert $\pm$ s) durch Corpus luteum Zellen in 4 h nach Zusatz von LH (NIH - B8)

Freisetzung / 10 ⁵ Zellen		h CG 0,5 I.E./ml	LH ng/ml			
			1	10	100	1000
Ocytocin pg	180 $\pm$ 18	196 $\pm$ 27	203 $\pm$ 16	188 $\pm$ 23	189 $\pm$ 23	228 $\pm$ 52
Progesteron ng	80 $\pm$ 6	167 $\pm$ 18	101 $\pm$ 4	152 $\pm$ 14	191 $\pm$ 32	225 $\pm$ 14
PGF ₂ α fmol	105 $\pm$ 17	96 $\pm$ 11	88 $\pm$ 15	113 $\pm$ 9	129 $\pm$ 19	148 $\pm$ 6

Das bisher noch nicht untersuchte Gonadotropin LH wurde auf seine Wirkung hin überprüft

Dabei zeigte sich für Ocytocin mit Ausnahme der höchsten verwendeten Konzentration (1000 ng/ml) keine Wirkung. Durch die große Streuung der Einzelwerte kann diese Erhöhung nicht als deutlich angesehen werden.

Deutlich hingegen zeigt sich eine dosisabhängige Steigerung der Progesteronfreisetzung durch Corpus luteum Zellen nach Zusatz von LH.

In ähnlicher Weise wie Progesteron (nur weniger deutlich ausgeprägt) wird auch die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Abgabe verändert. Mit steigender Dosis erhöht sich auch die freigesetzte Menge.

Auch in diesem Versuch ist eine Parallelität des Freisetungsverhaltens von Progesteron und $\text{PGF}_{2\alpha}$ zu beobachten. Auf einen derartigen Zusammenhang wurde bereits in dem vorhergehenden Experiment hingewiesen, so daß auch hier das oben Gesagte gelten mag.

5.2.4 Einfluß von FSH (NIH - S6)

Tab. 28 Vers. 4: In vitro Hormonfreisetzung (Mittelwert $\pm$ s) durch Corpus luteum Zellen in 4 h nach Zusatz von FSH (NIH - S6)

Freisetzung/ 10 ⁵ Zellen		hCG 0,5 I.E./ml	FSH ($\mu\text{g/ml}$)			
			0,05	0,5	5	50
Ocytocin pg	180 $\pm$ 18	196 $\pm$ 27	178 $\pm$ 23	193 $\pm$ 27	223 $\pm$ 27	259 $\pm$ 29
Progesteron ng	80 $\pm$ 6	167 $\pm$ 18	107 $\pm$ 9	112 $\pm$ 6	141 $\pm$ 5	220 $\pm$ 11
$\text{PGF}_{2\alpha}$ fmol	105 $\pm$ 17	96 $\pm$ 11	119 $\pm$ 14	140 $\pm$ 18	148 $\pm$ 19	248 $\pm$ 17

Bei Corpus luteum Gewebestücken schien FSH in hoher Konzentration eine Stimulierung der Ocytocinfreisetzung verursachen zu können.

Bestätigung fand diese Vermutung auch in diesem Experiment mit Corpus luteum Zellen. Mit steigender FSH-Dosis zeigt sich die Tendenz einer erhöhten Ocytocinfreisetzung.

Ebenfalls in Übereinstimmung mit dem Versuch mit Gewebestücken zeigt sich eine Steigerung der Progesteronfreisetzung durch die FSH-Zugabe. In dem in diesem Fall gewählten Konzentrationsbereich scheint sich aber diese stimulierende Wirkung mit steigender Dosis zu verstärken. Auch hier gilt die bereits erwähnte Einschränkung, daß wegen des in diesem FSH-Präparat (NIH-S6) enthaltenen LH-Anteils keine eindeutige Zuordnung der Wirkung vorgenommen werden kann.

Die Freisetzung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ wurde durch FSH gleichfalls gesteigert. Auch in diesem Fall ist die Erhöhung dosisabhängig.

Die Ergebnisse in diesem Versuch zeigte, daß das verwendete FSH-Präparat die Abgabe aller drei untersuchten Hormone an das Medium zu steigern vermochte.

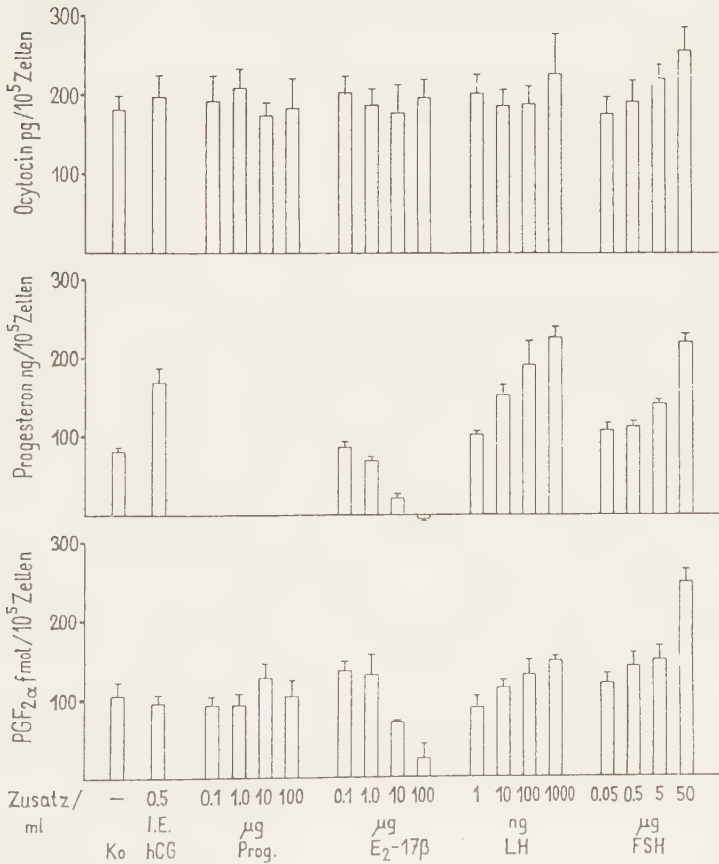
5.2.5 Einfluß von Ocytocin

Das in dieser Versuchsreihe ebenfalls überprüfte Ocytocin zeigte in den verwendeten Konzentrationen (1, 10, 100 und 1000 ng/ml Medium) keinen Einfluß auf die Progesteron- und $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Ausschüttung.

Obwohl es wegen der Höhe der zugesetzten Menge schwierig zu bestimmen war, scheint auch die Ocytocinausschüttung selbst unbeeinflusst geblieben zu sein.

Zum Vergleich sind die Ergebnisse der letzten vier Versuche noch einmal zusammenfassend in Abb. 4 dargestellt.

Abb. 4 In vitro Hormonfreisetzung (Mittelwert $\pm$ s) in 4 h durch von einem Corpus luteum stammenden Zellen nach Zusatz von Progesteron, Östradiol-17 β , LH (NIH - B8) und FSH (NIH - S6)



5.3 Einfluß von Prostaglandinen

In den nun abschließend behandelten Versuchen mit Corpus luteum Zellen konnte die Freisetzung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ nicht wie in den Versuchen mit Corpus luteum Gewebestücken durch Indomethazin gehemmt werden.

Ob eine zu niedrig gewählte Dosis dafür verantwortlich zu machen ist, oder ob andere Gründe dafür ausschlaggebend waren, wurde bisher noch nicht untersucht.

Die drei nachfolgend beschriebenen Versuche wurden ebenfalls mit von einem Corpus luteum (Tag 9 - 10) gewonnenen Zellen durchgeführt. Aus diesem Grund sind die Werte für die Kontrollgruppen identisch.

Daß Prostaglandine bestimmte Wirkungen auf das Ovar ausüben können ist wohl nicht mehr umstritten. Auch in den Versuchen mit Gewebestücken zeigten sich Einflüsse auf das Hormonfreisetzungsverhalten. So zeigten sowohl PGI_2 als auch PGE_2 eine die Progesteronfreisetzung stimulierende Wirkung. PGE_2 vermochte auch die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentration im Medium zu erhöhen.

Von beiden Prostaglandinen ging jedoch keine Wirkung auf die Ocytocinabgabe durch Corpus luteum Gewebestücke aus.

In den folgenden Inkubationsversuchen wurde sowohl die Wirkung der beiden eben erwähnten Prostaglandine als auch der Effekt von $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf Corpus luteum Zellen untersucht.

Tab. 29 Versuch 1: In vitro Hormonfreisetzung (Mittelwert $\pm$ s) durch

Corpus luteum Zellen in 4 h nach Zusatz von PGF₂ α

Freisetzung / 10 ⁵ Zellen	— hCG *	Indom. 5 μ g/ml		PGF ₂ α		PGF ₂ α + Indom. 5 μ g/ml	
		—	hCG *	1ng/ml	10ng/ml	1ng/ml	10ng/ml
Ocytocrin pg	119 $\pm$ 45	81 $\pm$ 28	52 $\pm$ 37	83 $\pm$ 33	85 $\pm$ 19	103 $\pm$ 26	124 $\pm$ 53
Progesteron ng	51 $\pm$ 3	176 $\pm$ 7	27 $\pm$ 11	85 $\pm$ 28	19 $\pm$ 7	42 $\pm$ 4	22 $\pm$ 3
PGF ₂ α fmol	55 $\pm$ 11	48 $\pm$ 11	69 $\pm$ 8	72 $\pm$ 28			

Tab. 30 Versuch 2: In vitro Hormonfreisetzung (Mittelwert $\pm$ s) durch

Corpus luteum Zellen in 4 h nach Zusatz von PGI₂¹⁾

Freisetzung / 10 ⁵ Zellen	— hCG *	Indom. 5 μ g/ml		PGI ₂		PGI ₂ + Indom. 5 μ g/ml	
		—	hCG *	1ng/ml	10ng/ml	1ng/ml	10ng/ml
Ocytocrin pg	119 $\pm$ 45	81 $\pm$ 28	52 $\pm$ 37	83 $\pm$ 33	92 $\pm$ 41	74 $\pm$ 40	108 $\pm$ 62
Progesteron ng	51 $\pm$ 3	176 $\pm$ 7	27 $\pm$ 11	85 $\pm$ 28	36 $\pm$ 7	33 $\pm$ 5	40 $\pm$ 9
PGF ₂ α fmol	55 $\pm$ 11	48 $\pm$ 11	69 $\pm$ 8	72 $\pm$ 28	47 $\pm$ 4	41 $\pm$ 16	53 $\pm$ 15

* 0.5 I.E./ml

1) Iloprost^R

5.3.1 Einfluß von $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Versuch 1; Tab. 29)

Auch in diesem Versuch zeigte Ocytocin eine große Streuung der Einzelwerte. Der Zusatz von Indomethazin führte zu einer im Durchschnitt um mehr als 50 % verminderten Abgabe an das Medium im Verlauf der Inkubationszeit im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

$\text{PGF}_{2\alpha}$ alleine bewirkte keine Veränderung der Ocytocinfreisetzung, verglichen mit der zur unbehandelten Kontrolle. Durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Zusatz (1 und 10 ng/ml) in Kombination mit Indomethazin stieg die Ocytocinabgabe an das Medium im Vergleich zur nur mit Indomethazin behandelten Probe. In der Dosis von 100 ng/ml zeigte $\text{PGF}_{2\alpha}$ keine Wirkung.

Bemerkenswert in dieser Versuchsreihe ist auch, daß durch Indomethazinzusatz die Progesteronfreisetzung deutlich erniedrigt wird. In den vorhergehenden Versuchen mit Corpus luteum Gewebe hatte sich in verschiedenen Versuchen entweder keine oder eine stimulierende Wirkung auf die Progesteronfreisetzung gezeigt. In Verbindung mit Indomethazin zeigt hCG zwar immer noch eine stimulierende Wirkung auf die Progesteronfreisetzung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Steigerung der Abgabe ist jedoch geringer als in den nur mit hCG behandelten Proben.

Bei Zusatz von $\text{PGF}_{2\alpha}$ zum Inkubationsmedium scheinen die beiden niedrigen untersuchten Konzentrationen (1 und 10 ng/ml) eine Hemmung von Progesteron zu bewirken. Diese zugesetzten Konzentrationen sind im Vergleich zur eigenen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Ausscheidung (umgerechnet knapp unter 20 pg/ 10^5 Zellen) eine relativ große Dosis. Bei noch höherer $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentration verliert sich der hemmende Einfluß jedoch wieder.

Im Vergleich zur mit Indomethazin behandelten Kontrollgruppe zeigt $\text{PGF}_{2\alpha}$ in Kombination mit Indomethazin keine Wirkung auf die Progesteronfreisetzung.

5.3.2 Einfluß von PGI_2 (Versuch 2)

Ocytocin zeigt keine Veränderung der Konzentration zwischen der unbehandelten und der mit PGI_2 in verschiedenen Dosen behandelten Gruppe. In Verbindung mit Indomethazin ergibt sich jedoch im Vergleich zur Indomethazin-Kontrolle eine deutliche Steigerung der Ocytocinfreisetzung.

PGI_2 alleine übt möglicherweise einen hemmenden Einfluß auf die Progesteronfreisetzung aus. In Verbindung mit Indomethazin ergibt sich, verglichen mit der entsprechenden Kontrollgruppe, kein Effekt auf die Abgabe.

Die Konzentration des im Medium gefundenen $\text{PGF}_{2\alpha}$ s wird durch die erwähnten Zusätze alleine oder in Kombination nicht beeinflusst.

Tab. 31 Versuch 3: In vitro Hormonfreisetzung (Mittelwert $\pm$ s) durch
Corpus luteum Zellen in 4 h nach Zusatz von PGE_2

Freisetzung / 10^5 Zellen	hCG *		Indom. $5\mu\text{g/ml}$		PGE_2		$\text{PGE}_2 + \text{Indom.}$	
	—	hCG *	—	hCG *	1ng/ml	10ng/ml	1ng/ml	10ng/ml
Ocytocin pg	119 $\pm$ 45	81 $\pm$ 28	52 $\pm$ 37	83 $\pm$ 33	93 $\pm$ 43	133 $\pm$ 46	66 $\pm$ 21	43 $\pm$ 40
Progesteron ng	51 $\pm$ 3	176 $\pm$ 7	27 $\pm$ 11	85 $\pm$ 28	32 $\pm$ 3	39 $\pm$ 7	19 $\pm$ 1	26 $\pm$ 3
$\text{PGE}_{2\alpha}$ fmol	55 $\pm$ 11	48 $\pm$ 11	69 $\pm$ 8	72 $\pm$ 28	56 $\pm$ 9	58 $\pm$ 17	44 $\pm$ 11	50 $\pm$ 2
								160 $\pm$ 14

* 0.5 I.E./ml

5.3.3 Einfluß von PGE_2

Die Ocytocinfreisetzung wird durch PGE_2 in hoher Konzentration (100 ng/ml) deutlich gehemmt. Keine Wirkung zeigen die beiden niedrigen Dosen (1 und 10 ng/ml) in Verbindung mit Indomethazin, verglichen mit der Indomethazin-Kontrollgruppe. Im Gegensatz zum vorher gezeigten scheint PGE_2 in einer Konzentration von 100 ng/ml kombiniert mit Indomethazin die Ocytocinfreisetzung zu fördern.

Die Progesteronabgabe wird in beiden Versuchsgruppen (mit und ohne Zusatz von Indomethazin) gehemmt, wobei diese Wirkung mit steigender Dosis in beiden Fällen praktisch verschwindet.

Die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Abgabe wird in einer Weise, wie sie von den Gewebestücken her bekannt ist, beeinflußt. Mit steigendem Zusatz von PGE_2 erhöht sich auch die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentration im Medium. Wie schon bei Corpus luteum Gewebestücken beobachtet, scheinen also auch Corpus luteum Zellen die Fähigkeit zu besitzen, PGE_2 in $\text{PGF}_{2\alpha}$ umzuwandeln.

5.4 Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen 5.1 - 5.3

In den Versuchen mit Corpus luteum Zellen wurde gezeigt, daß eine Reihe von Stoffen Wirkungen auf die Ocytocinfreisetzung haben können. Hier müssen vor allem die zuletzt besprochenen Prostaglandine erwähnt werden. Wie die mit und ohne Indomethazinzusatz gefundenen Werte zeigten, scheint dabei ein komplexes Wechselspiel der einzelnen Prostaglandine von Bedeutung zu sein.

Eine mögliche Erklärung für die trotz Indomethazinzusatz gefundenen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Werte im Medium könnte in der Art der Aufarbeitung liegen. Es scheint möglich, daß als Reaktion bei der Herstellung der Zellsuspension eine erhöhte Prostaglandinsynthese abläuft. Dieses bereits gebildete Prostaglandin

wird auch nach Beginn der Inkubation in das Medium abgegeben. Eine Neusynthese jedoch wäre gehemmt. Eine Interpretation der in diesen drei Versuchen gefundenen Ergebnisse kann, solange nicht durch weitergehende Versuche die auftretenden Veränderungen geklärt werden, nur Spekulation sein.

Bestätigt werden konnte die bereits bei Corpus luteum Gewebestücken angestellte Vermutung, wonach das verwendete FSH-Präparat (NIH - S6; mit LH-Anteil!) eine stimulierende Wirkung auf die Ocytocinfreisetzung haben könnte.

Eine Wirkung von Östradiol-17 β wurde im Gegensatz zu den bei Gewebestücken gefundenen Ergebnissen nicht beobachtet. Ebenfalls im Gegensatz zu dem bei Gewebestücken gefundenen Resultaten, zeigte E₂-17 β einen hemmenden Einfluß auf die Progesteronfreisetzung durch Corpus luteum Zellen.

Abschließend sei noch einmal auf das in einigen Versuchen möglicherweise gekoppelte Freisetzungsverhalten einiger Hormone verwiesen. So zeigten Progesteron und PGF_{2 α} nach LH-Zusatz in ähnlicher Weise einen Anstieg. FSH vermochte Progesteron-, PGF_{2 α} - und Ocytocinfreisetzung gleichermaßen zu steigern. Der hemmende Einfluß von E₂-17 β auf die Progesteronabgabe zeigte sich ebenfalls bei PGF_{2 α} .

Um die in Ihrer Gesamtheit sehr vielfältigen Ergebnisse zu verdeutlichen, werden die Resultate der einzelnen Versuche in Tabelle 32 noch einmal zusammengefaßt dargestellt. Dabei ist deutlich zwischen Tendenzen und klaren Wirkungen zu unterscheiden (Zeichenerklärung siehe unten)

Tab. 32 Wirkung verschiedener Zusätze auf die Hormonfreisetzung von Corpus luteum Zellen und Gewebe

Zusatz	Gewebe			Zellen		
	Ocyt.	Prog.	PGF ₂ α	Ocyt.	Prog.	PGF ₂ α
hCG	±	++	n. u.	±	++	±
FSH (NIH-S6)	+	++	n. u.	+	++	++
LH (NIH-B8)	n. u.	n. u.	n. u.	+	++	+
Ocytocin	n. u.	n. u.	n. u.	0	0	0
Progesteron	n. u.	n. u.	n. u.	0	- ²⁾	0
E ₂ -17β	±	0	n. u.	0	--	-
PGF ₂ α	n. u.	n. u.	n. u.	±	(-) 0	n. u.
PGE ₂	0	++	++	± ³⁾	(-) 0	++
PG I ₂ (Iloprost®)	0	++	0	+	(-) 0	0
Cloprostenol	0	0	++ ¹⁾	n. u.	n. u.	n. u.
Indomethazin	0	0	--	-	-	0

1) Nicht überprüft auf Kreuzreaktion mit PGF₂α-Antikörper

2) Nicht überprüft auf genaue zugesetzte Menge

3) +: In Komb. mit Indomethazin
-: als alleiniger Zusatz

Erklärung der Zeichen
siehe nächste Seite

Wirkung auf die Freisetzung:

- ++ eindeutig fördernd
- eindeutig hemmend
- ± Tendenz, bei verschiedenen Versuchsbedingungen entweder hemmend oder fördernd zu wirken
- + Tendenz fördernd zu wirken
- Tendenz hemmend zu wirken
- 0 keine erkennbare Wirkung
- n.u. nicht untersucht

Die Übersicht zeigt, daß eine Wirkung der Gonadotropine auf die Ocytocinfreisetzung nicht ausgeschlossen werden kann. Interessant ist hier vor allem die Wirkung von FSH.

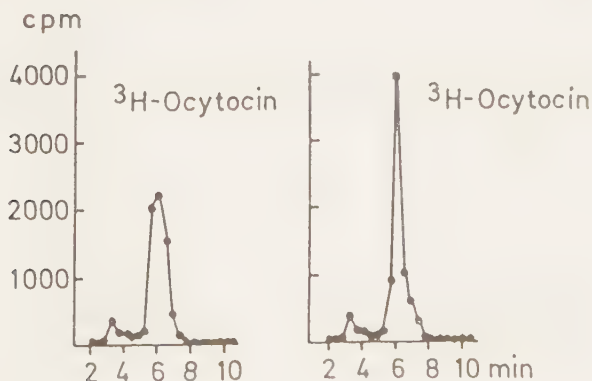
Auch die Ergebnisse der Prostaglandinversuche zeigen, daß diese Stoffgruppe durchaus eine näheren Untersuchung wert sind.

6 Hochleistungsflüssigkeitchromatographie (HPLC)
einiger stichprobenartig ausgewählter Proben
aus den durchgeführten Versuchen

Zur Überprüfung der in den verschiedenen Gewebeextrakten und im Inkubationsmedium gefundenen Ocytocinwerte wurden einzelne zufällig ausgewählte Proben in einem isograden HPLC-System untersucht. Zum Vergleich und zur Kontrolle wurden tritiummarkiertes (^3H -) Ocytocin, 4.Internat. Standard für Ocytocin und eine Plasmaprobe eluiert.

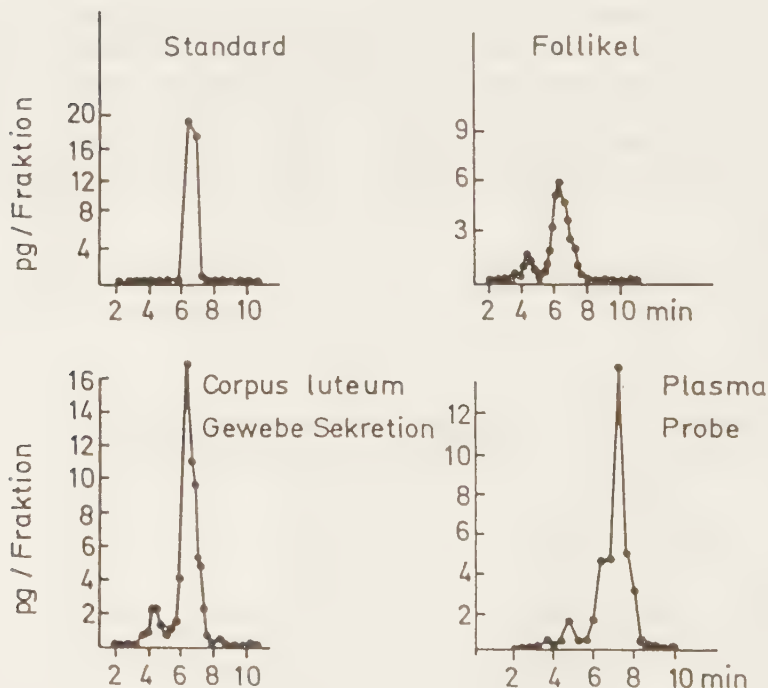
Mit tritiummarkierten Ocytocin zeigte sich ein erster kleiner Gipfel zwischen 3 und 4 min. Laufzeit, dem 2 min. später, also zwischen der 6. und 7 min. der Hauptgipfel mit über 80 % des radioaktiven Materials folgte (Abb. 8). Der Ocytocinstandard (4. Int.St.) eluierte als einheitlicher Gipfel immunreaktiven Ocytocins ebenfalls zwischen der 6. und 7. min..

Abb. 5 Elutionsverhalten von ^3H -Ocytocin bei HPLC



Ocytocin aus Proben, die keiner weiteren Manipulation unterworfen waren, zeigten ein ähnliches Verhalten, wie ^3H -Ocytocin (siehe Abb. 9). Nach einem relativ kleinen Vorgipfel bei 3 bis 4 min. kam der Hauptgipfel zwischen der 6. und 7. Minute. Dies trifft für das in der Follikelflüssigkeit vorhandene sowie für das vom Corpus luteum Gewebe in das Medium abgegebene Ocytocin zu. Auch eine ebenfalls untersuchte Plasmaprobe verhielt sich so.

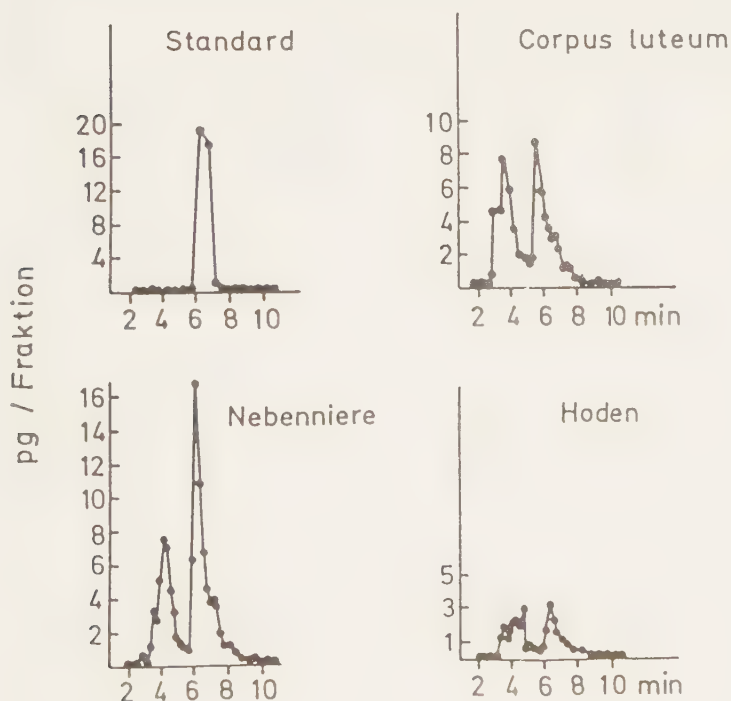
Abb. 6 Elutionsverhalten von Ocytocinstandard und biologischen Proben bei HPLC (Immunreaktives Ocytocin)



Bei Proben aus den Gewebeextrakten lagen die Verhältnisse anders (siehe Abb. 10).

Hier war der erste Gipfel (3.-4.min.) wesentlich stärker ausgeprägt. So ist bei den Extrakten aus Corpus luteum und Hoden die Verteilung des immunreaktiven Ocytocins auf 1. und 2. Gipfel etwa 1 : 1 . Bei dem Extrakt aus der Nebenniere beträgt dieses Verhältnis ca. 2 : 3 .

Abb. 7 Elutionsverhalten immunreaktiven Ocytocins aus biologischen Proben (Äthanolextraktion)



Die gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, daß die Äthanol-extraktion für das veränderte Elutionsverhalten verantwortlich ist. Bei dieser Methode der isograden Elution werden selbst kleine Veränderungen an einem Molekül erfaßt. Möglicherweise ist durch die Gewebeextraktion das Ocytocin-molekül in irgendeiner Weise verändert. Das in diesem Test verwendete Antiserum ist mittlerweile so gut abgesichert, daß eine Kreuzreaktion mit anderen, ähnlichen Verbindungen so gut wie ausgeschlossen ist. Aus diesen Gründen ist vermutlich auch das im ersten Gipfel eluierte immunreaktive Material Ocytocin, das durch die vorhergehende Behandlung eine, die Antikörperbindung nicht beeinträchtigende Veränderung erfahren hat und daher ein anderes Abtrennungsverhalten zeigt.

IV DISKUSSION

1 Ergebnisse der Gewebeextraktionen

Die Feststellung über das Vorkommen von Ocytocin im bovinen testikulären Gewebes stimmen mit den von NICHOLSON et al. (1984) im Hoden von Menschen und Ratte gefundenen Ergebnissen überein. Die beim Rind vorliegende Konzentration von durchschnittlich 53 pg/g Naßgewicht liegt jedoch wesentlich unter den bei diesen Autoren für den Menschen (0.6 - 3.0 ng/g Naßgewicht) und die Ratte (2.5 und 6.6 ng/g Naßgewicht) angegebenen Werten. Überträgt man dieses Ergebnis jedoch auf die absolute Größe des Organs, so zeigt sich, daß im Hoden des Bullen erhebliche Mengen an Ocytocin vorhanden sind. Bei einem durchschnittlichen Gewicht von 250 - 300 g (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE, 1975) ergeben sich Ocytocingehalte zwischen 27 und 32 ng für beide Gonaden. Im Vergleich dazu liegt im Hoden des Mannes bei einem Gewicht von etwa 20 g pro Organ (EDER & GEDIGK, 1984) ein Gesamtocytocingehalt in einer ähnlichen Größenordnung vor.

Basale Ocytocinwerte liegen beim Bullen unter 3 pg/ml Plasma (BAUMANN, 1980) und es ist daher unwahrscheinlich, daß die gefundenen Werte durch zirkulierendes Ocytocin verursacht werden.

Über die Bedeutung des Ocytocins im Hoden gibt es bis dato nur Vermutungen. Beim Kaninchen konnten FJELLSTRÖM et al. (1968) eine Erhöhung des Ejakulatvolumens und der Spermienzahl durch Ocytocininjektionen beobachten.

SHARMA & HAYS (1976) zeigten, daß Ocytocin beim Kaninchen möglicherweise eine Wirkung auf den Spermientransport hat. Durch Blockade der Ocytocinfreisetzung riefen sie eine Erniedrigung der Spermienzahl im Ejakulatvolumen hervor. Von einigen Autoren wird ein Zusammenhang mit der Steroidsynthese vermutet. ADASHI & HSUEH (1981) haben bei der Ratte eine Hemmung der testikulären Androgensynthese in vitro durch hohe Dosen von Ocytocin (und Vasopressin) nachgewiesen.

Die relativ hohen Konzentrationen von Ocytocin im Hoden beim Bullen deuten auf eine Speicherung oder auf eine lokale Synthese hin. Weitere Versuche sind notwendig, um eine dieser Vermutungen zu bestätigen und um die Bedeutung dieser Ergebnisse näher zu beleuchten.

Ocytocin in der Nebenniere wurde bisher bei der Ratte (ANG & JENKINS, 1984) und beim Menschen (NICHOLSON ET AL., 1984, ANG & JENKINS, 1984) nachgewiesen. Ang und Jenkins fanden im Nebennierenmark der Ratte 19.9 ng Ocytocin / g Naßgewicht, in Nebennieren des Menschen 68 und 163 ng/g Naßgewicht. Beim Menschen wurde auch das entsprechende Neurophysin in hoher Konzentration nachgewiesen. Den Ocytocingehalt menschlicher fetaler Nebennieren bestimmten Nicholson et al. mit 6 ng/g Trockengewicht.

In der ersten Untersuchung zeigte sich ein interessanter Unterschied im Verhalten der Ocytocin-Konzentrationen. Während bei allen männlichen Tieren nahezu identische Werte erhalten wurden, zeigte sich eine sehr große Schwankungsbreite bei den untersuchten Nebennieren weiblicher Tiere. Eine Möglichkeit wäre, den zyklischen Ablauf des Fortpflanzungsgeschehens bei Kühen als Grund für diese Veränderungen anzusehen. Übereinstimmend mit dieser Hypothese kommt es beim Bullen und dessen kontinuierlich ablaufenden Sexualfunktionen zu keinen Veränderungen.

Der Vergleich zwischen Kortex und Medulla zeigt, daß der Hauptanteil des "Nebennieren-Ocytocins" aus dem Mark kommt. Der Unterschied ist so groß, daß die in der Rinde gefundenen Werte möglicherweise auch auf Kontamination während der Aufarbeitung zurückzuführen sind, da die Abtrennung der beiden Anteile und deren Zerkleinerung, jeweils mit dem gleichen Skalpell durchgeführt wurde.

Auf Grund seiner Struktur wird das Nebennierenmark oftmals als Ganglion des sympathischen Nervensystems angesehen (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE, 1975). Ang und Jenkins postulieren eine regulierende Funktion der neurohypophysären Peptide auf die Katecholaminsekretion. Auch SOFRONIEW (1983) weist in seiner Arbeit auf die von anderen Autoren gefundene Wirkung von Ocytocin und Vasopressin auf c-AMP und Katecholaminstoffwechsel in bestimmten Gehirnregionen hin. Die Beeinflussung der c-AMP-Produktion wäre auch in anderen Organen, wie eben der Nebenniere eine denkbare Möglichkeit, indirekt auf die Steroidproduktion zu wirken.

Die im Gelbkörper beim Rind gefundenen Ergebnisse lassen sich mit den von WATHES et al. (1983a, 1984) gezeigten vergleichen.

Sie fanden ebenfalls ein Ansteigen des Ocytocingehaltes im bovinen Corpus luteum bis etwa zur Zyklusmitte und einen anschließenden Abfall. Im Corpus luteum graviditatis lag der Ocytocingehalt unter der Nachweisgrenze. Die von uns gefundenen Konzentrationen betragen jedoch nur ca. 1/5 der von diesen Autoren angegebenen Werte. In zwei Punkten unterscheiden sich diese beiden Versuche hauptsächlich. Erstens wurden unterschiedliche Extraktionsverfahren eingesetzt und zweitens wurden die Proben von unterschiedlichen Rinderrassen gewonnen. Während Wathes et al. Proben von Rindern der Rasse Holstein-Friesian untersuchten, stammten die Proben in unseren Versuchen von Tieren der Rasse Deutsches-Fleckvieh. Eine Aussage über die tatsächlichen Gründe kann jedoch nicht

gemacht werden, da weder die eine noch die andere mögliche Ursache bisher direkt verglichen wurde.

Die in beiden Studien gemachte Beobachtung, wonach der Ocytocingehalt im Corpus luteum bereits in der zweiten Hälfte des Zyklus wieder absinkt, stimmen mit den im peripheren Blut gezeigten Ocytocinprofilen überein (SCHAMS, 1983, BULLERMANN, 1984, BREITINGER, 1984)

FLINT & SHELDRICK (1983) wiesen bei Schafen ebenfalls Ocytocin (1,5 ug/g Naßgewicht) im Gelbkörper nach.

Nach RODGERS et al. (1983 b) sind vor allem die großen Lutealzellen Quelle der Ocytocin-Produktion beim Schaf.

Der Abfall in den Ocytocinkonzentrationen im Corpus luteum ab der mittleren Lutealphase trifft in etwa mit den von einigen Autoren gefundenen Zeitpunkt des Verlustes der Teilungsfähigkeit von Lutealzellen zusammen (MOSS et al., 1954; DONALDSON & HANSEL, 1965, PRIEDKALNS et al. 1968). Nach Donaldson & Hansel treten zu diesem Zeitpunkt auch bereits die ersten Degenerationerscheinungen in Gelbkörperzellen auf.

Von Interesse ist in diesem Zusammenhang auch die heute von vielen Autoren vertretene Theorie, wonach die großen Lutealzellen von den Granulosazellen, die kleinen Lutealzellen von den Theka interna Zellen abstammen. Die Umbildung der Granulosazellen soll bereits vier Tage nach der Ovulation abgeschlossen sein. Verantwortlich für die weitere Größenentwicklung des Gelbkörpers sind die aus der Theka interna entstehenden Luteinzellen (DONALDSON & HANSEL, 1965).

GULDENAAR et al. (1984) konnten inzwischen in den großen Corpus luteum Zellen immunzytochemisch Ocytocin nachweisen. Es ergibt sich hier eine Parallelität mit beim Schaf gefundenen Ergebnissen (RODGERS et al. 1983 b), wonach die großen Lutealzellen der Ort der Ocytocinsynthese sind. Dies wäre die mögliche Erklärung für den relativ frühen Abfall der Ocytocin-Konzentration im Vergleich zur Progesteronkonzentration.

2 Ergebnisse der Untersuchung boviner Follikel

Abgesehen von einer relativ großen Variationbreite ändert sich der Ocytocingehalt in der Follikelflüssigkeit pro Volumeneinheit mit der Größenzunahme kaum. Auch Zysten weichen von diesem Verhalten nur wenig ab. Mit der Größenzunahme steigt jedoch der Gesamt-Ocytocingehalt der Follikel deutlich an. Relativ hohe Mengen sind, bedingt durch deren Größe, in Zysten enthalten.

Kleine Follikel auf konventionellen Gitter-System in serum-freien und serumhaltigen Medium inkubiert geben relativ geringe Mengen Ocytocin an das Inkubationsmedium ab (8 - 19 pg/Foll/24h). Inkubiert man dagegen große Follikel in serumhaltigen Medium im "Continuous Flux System", so erhält man wesentlich höhere Freisetzungsraten (ca. 1.7 ng/Foll/24h). Dieser Unterschied läßt sich eigentlich nur durch eine stattgefundene Luteinisierung im "Continuous Flux System" erklären. Dies zeigt sich auch im nachfolgenden Versuch, in dem bei Follikeln aller Größen ein Anstieg der Ocytocinfreisetzung erfolgte. In diesem Zusammenhang soll der von McNATTY et al. (1984) durchgeführte Versuch erwähnt werden, in dem eine Steigerung in der Steroidsynthese durch Erhöhung der Durchflußrate im in vitro Perfusionssystem beobachten werden konnte. Inwieweit dadurch auch Ocytocin zu beeinflussen ist, ist eine Frage die der Klärung erst bedarf.

Bei der Untersuchung der in vitro Ocytocinfreisetzung der beiden Zellpopulationen (Granulosa- und Thekazellen) von Follikeln ergab sich für beide Zellarten ein Anstieg der Ocytocin-Akkumulation im Medium, der aber bei den Granulosazellen auf einem wesentlich höheren Niveau verlief (Ocytocinfreisetzung / mg Protein / 40 h: Granulosazellen - 685 pg/ml; Thekazellen - 46 pg/ml Medium). Es ist daher möglich, daß das in den Theka Proben gewonnene Ocytocin von nicht ganz entfernten Granulosazellen freigesetzt wurde.

Allerdings deuten Untersuchungen von KRUIP (unveröffentlicht) darauf hin, daß auch in Thekazellen Ocytocin enthalten ist. Durch zytohistochemische Nachweisverfahren konnte Ocytocin in Theka interna Zellen dargestellt werden.

Progesteron hingegen scheint von beiden Zellarten abgegeben zu werden. Hierin besteht Übereinstimmung mit von FORTUNE & HANSEL (1979) berichteten Ergebnissen.

Die Resultate zeigen, daß bereits der Follikel in der Lage ist, Ocytocin abzugeben und vermutlich auch zu synthetisieren. Die Abgabe scheint aber, wie die vorgefundenen Konzentrationen vermuten lassen nur, zu einem geringeren Teil in die Follikelflüssigkeit zu erfolgen

Die vorliegenden Versuchsbedingungen führten mit großer Sicherheit zur Luteinisierung der inkubierten Zellen. In vivo setzt die Luteinisierung bereits einige Stunden vor der Ovulation ein (DONALDSON & HANSEL, 1965). Ein Anstieg in der Ocytocinkonzentration, wie er von uns in vitro beobachtet wurde, könnte also auch beim praeovulatorischen Follikel in vivo auftreten. Aus diesem Grund scheint es möglich, daß dem Ocytocin bereits um die Ovulation eine noch nicht näher beschriebene Rolle zukommt. In einer Übersichtsarbeit weist ESPEY (1978) darauf hin, daß die Kontraktionsfähigkeit des Ovars vermutlich eine Rolle im Ablauf des Ovulationsgeschehens spielt. Zum einen könnte die Kontraktilität bei der "Versorgung der Ovulationswunde", zum anderen bei dem Zusammenspiel von Ovar und Ovidukt während des Eisprungs von Bedeutung sein. Ocytocin und $\text{PGF}_{2\alpha}$ haben einen stimulierenden Einfluß auf die Ovarkontraktilität.

3 Inkubationsversuche mit Corpora lutea

Bevor die Ergebnisse der in vitro Untersuchungen mit bovinen Corpora lutea diskutiert werden, muß auf die grundsätzliche Problematik dieses Bereichs hingewiesen werden.

Viele Untersucher haben sich mit ähnlichen Aspekten befaßt. Dennoch ist es nicht ohne weiteres möglich, die Resultate zu vergleichen. Ganz abgesehen von der Bedeutung der untersuchten Tierart gibt es eine Reihe von Faktoren, die einen Einfluß auf den Versuchsablauf haben können. Zuerst sei die Art der Aufarbeitung genannt. Wie gezeigt wurde und auch später noch aufgeführt wird, ist es durchaus von Bedeutung, ob Gewebestücke, Zellkulturen oder Zellsuspensionen verwendet werden. Bei den beiden zuletzt genannten Verfahren, ist die Art der Aufarbeitung des Gewebes als nächste Variable zu nennen. Auch die Art der Inkubation (Medium, Gaszusammensetzung, Luftfeuchtigkeit, Versuchsdauer, etc.) kann einen wichtigen Einfluß auf die späteren Resultate haben. Für den Fall, daß Zusätze auf ihre Wirkung hin überprüft werden, ist zu beachten, daß hinsichtlich der von vielen Autoren angegebenen Konzentrationen zum Teil erhebliche Differenzen bestehen. Aus diesen und ähnlichen Gründen ist ein direkter Vergleich der erzielten Werte problematisch.

Die Beurteilung, ob eine verwendete Dosis noch dem physiologischen Bereich zuzuordnen ist, gestaltet sich häufig schwierig. Auf der einen Seite ist die Frage, welche Konzentrationen tatsächlich in vivo am Wirkungsort, also in diesem Fall an der Corpus luteum Zelle vorliegen, nicht einfach zu beantworten. Auf der anderen Seite ist es ebenso unklar, inwiefern in vitro und hier speziell bei Inkubation von Gewebestücken, die zugesetzten Hormone den Ort der Wirkung erreichen, d.h. ob hier nicht etwa die Notwendigkeit besteht, relativ hohe Konzentrationen einzusetzen. Es ist also schwierig zu entscheiden, ob es sich bei einer erzielten

Wirkung um eine auch physiologischerweise auftretende Reaktion, oder um einen pharmakologischen Effekt handelt.

Viele Autoren untersuchen bei den in vitro Proben inkubiertes Gewebe und Medium gleichzeitig. In den vorliegenden Versuchen wurden nur die vom Corpus luteum Gewebe bzw. den Zellen an das Medium abgegebenen Hormone untersucht.

Ebenso, wie in der Literatur zum Teil konträre Ergebnisse über die Wirkung verschiedener Substanzen vorliegen, konnten auch in diesen Versuchen teilweise unterschiedliche Resultate vor allem im Vergleich zwischen Corpus luteum Gewebestücken und Zellen beobachtet werden.

So konnte der stimulierende Effekt von $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf die Progesteronsynthese (SHEMESH et al. 1975, bei Gewebestücken, WESTON & HIXON, 1980, bei Zellen) nicht nachvollzogen werden. Ein Vergleich zeigt, daß diese Autoren wesentlich höhere Dosen zur Erzielung dieses Effektes eingesetzt hatten (bis in den μg Bereich). Ein weiterer Unterschied liegt in der Dauer der Inkubation. Während oben genannte Autoren eine bzw. zwei Stunden inkubierten, betrug die Inkubationszeit in unserem Versuch vier Stunden. O'GRADY et al. (1972) zeigten, daß bei längeren Inkubationszeiten (6 h) sogar eine Hemmung der Progesteron-Produktion durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ auftritt. McCRACKEN et al. (1970) konnten in vivo einen ähnlichen Effekt erzielen. $\text{PGF}_{2\alpha}$ Infusion ins Ovar beim Schaf, wurde nach einem anfänglichen Anstieg, von einem deutlichen Abfall der Progesteron-Konzentration gefolgt.

In Übereinstimmung mit den hier vorgestellten Resultaten bei Rinder Corpus luteum Zellsuspensionen, konnten FLETCHER & NISWENDER (1982) bei Corpus luteum Gewebestücken des Schafes keine Stimulierung der Progesteron-Freisetzung durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ beobachten. Auch STOCK (1984) fand bei bovinen Gelbkörperzellkulturen keinen die Progesteronabgabe fördernden Effekt von $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Der von TAN et al. (1982) gezeigte stimulierende Effekt von Ocytocin auf die Progesteron-Freisetzung wurde im Unterschied zu den vorliegenden Versuchen mit Zellen aus Corpora lutea graviditatis durchgeführt. Da die Ergebnisse der Extraktionsversuche gezeigt hatten, daß Gelbkörper gravider Tiere nur sehr wenig Ocytocin enthalten, ist eine andere Reaktion dieser Zellen im Vergleich zu solchen aus Corpora lutea periodica, welche hohen Ocytocin-Konzentrationen enthalten, nicht verwunderlich. Aus diesem Grund kann auch die Wirkung von Ocytocin während der Gravidität eine völlig andere sein, als im Zyklus.

Im Gegensatz zu in vivo Experimenten, bei denen nach Cloprostenol-Applikation ein deutlicher Abfall der Progesteron-, sowie ein Anstieg der Ocytocin-Freisetzung erfolgte (SCHAMS & KARG, 1982) wurde die Sekretion dieser beiden Hormone durch Corpus luteum Gewebestücke in vitro nicht beeinflusst. Dies deutet auf unterschiedliche Mechanismen für das Wirken des Prostaglandin-Analogs in vivo und in vitro hin. Es könnte dies ein Hinweis auf die bekannte Vermutung sein, wonach der luteolytische Wirkung von Prostaglandinen über die Regulation des Blutflusses erfolgt (PHARRIS, et al. 1970). NISWENDER et al. (1973) wiesen eine selektive Reduzierung des Blutflusses zum Corpus luteum beim Schaf zum Zeitpunkt der Regression nach und THORBURN et al. (1972) zeigten, daß dieser Effekt auch durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ hervorgerufen werden kann.

Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen von EINER-JENSEN & McCracken (1976), die zeigten, daß der luteolytische Effekt von $\text{PGF}_{2\alpha}$ nicht notwendigerweise mit einer Reduzierung des Blutflusses verbunden ist.

Alle diese Untersuchungen weisen darauf hin, daß die Wirkungsweise des $\text{PGF}_{2\alpha}$ s bei der Luteolyse noch nicht eindeutig geklärt ist. Unklar ist außerdem, ob Cloprostenol über die-
selben Mechanismen wirkt wie $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Den Einfluß von Cloprostenol auf das menschlich Corpus luteum untersuchten in einem Superfusionssystem McDUGALL et al. (1977). Dabei zeigte sich ein anfänglicher Abfall der Progesteronkonzentration, welche jedoch nach relativ kurzer Zeit wieder ursprüngliche Werte erreichte. Die $\text{PGF}_{2\alpha}$ Ausschüttung in diesem Versuch wurde durch die Behandlung über die Dauer von einigen Stunden wesentlich erhöht.

Auch in den hier vorgestellten Versuchen mit Cloprostenol ergab sich ein Anstieg der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentration nach Zusatz der Substanz zum Inkubationsmedium, unter dem Vorbehalt, daß das verwendete $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Antiserum noch nicht auf eine mögliche Kreuzreaktion mit Cloprostenol überprüft wurde.

In Übereinstimmung mit MARSH (1970) konnte gezeigt werden, daß PGE_2 die Progesteron-Synthese bei Corpus luteum Gewebe stimuliert. Bei Untersuchungen mit menschlichen Corpus luteum Gewebestücken (MAEYAMA et al. 1976) konnte ebenfalls ein stimulierender Effekt von PGE_2 auf die Progesteron-Produktion nachgewiesen werden.

Diese Wirkung konnte bei den Corpus luteum Zellen, die allerdings mit wesentlich geringeren Konzentrationen behandelt worden waren, nicht mehr beobachtet werden. Inwieweit höhere Dosierungen auch bei Zellen stimulierend wirken können, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Der in Gewebestücken gezeigte Anstieg der Progesteronfreisetzung nach Zugabe von PGE_2 wurde auch von STOCK (1984) bei Zellkulturen aus bovinen Corpora lutea gefunden. Der Verband der Zellen, wie er im Corpus luteum Gewebestück erhalten ist und den Corpus luteum Zellen in der Kultur wieder erlangen,

scheint also wichtig zu sein für die Fähigkeit auf bestimmte Reize zu reagieren bzw. zu agieren. Dies läßt auf eine Bedeutung der parakrinen Sekretion des Gelbkörpergewebes schließen. Auch HAMBERGER et al. (1979) kommen in ihren Untersuchungen am Corpus luteum des Menschen zu dem Schluß, daß die Gewebsintegrität für gewisse Funktionen von $\text{PGF}_{2\alpha}$ von Bedeutung ist, eine Aussage die vermutlich auch für PGE_2 übernommen werden kann.

Nach MARSH (1971) wirkt PGE_2 über die Steigerung der c-AMP-Produktion stimulierend auf die Progesteron-Synthese. Auch $\text{PGF}_{2\alpha}$ soll auf diese Weise wirksam sein. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, daß PGE_2 im bovinen Corpus luteum auch in $\text{PGF}_{2\alpha}$ umgewandelt werden kann.

Unterstützt wird dieser Befund durch Arbeiten von HENSBY (1974). Er zeigte, daß im Blut des Schafes ein Enzym existiert, daß in der Lage ist, PGE_2 zu $\text{PGF}_{2\alpha}$ zu reduzieren.

MILVAE & HANSEL (1983 b) fanden, daß sich das Verhältnis von PGI_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ während des Zyklus ändert. Sie glauben, daß die Balance luteolytischer und luteotroper Prostaglandine die Corpus luteum Funktion reguliert. Die Umwandlung von PGE_2 , daß einige Autoren für luteotrop halten, in $\text{PGF}_{2\alpha}$, dessen luteolytische Wirkung bekannt ist, wäre ein gutes Instrument, die Balance der Prostaglandine zu regulieren.

Während Progesteron bei den Gewebestücken durch PGE_2 stimulierbar war, zeigt sich eine eher hemmende Wirkung von PGE_2 auf die Ocytocinfreisetzung bei den Corpus luteum Zellen.

REYNOLDS et al. (1983) beobachteten, daß eine intrauterine Infusion von Östradiol-17 β und PGE_2 die Luteolyse hinauschieben kann. Auch Östradiol-17 β hatte möglicherweise bei bestimmten Dosierungen einen vermindernenden Einfluß auf die Ocytocinfreisetzung.

Bei dem von Reynolds beschriebenen Versuch zeigte sich ein additiver Effekt dieser beiden Hormone. Ob PGE_2 und Östadiol-17 β in vitro gemeinsam eine Unterdrückung der Ocytocinfreisetzung bewirken können, wurde bisher noch nicht untersucht.

In allen Versuchen sowohl mit Gewebestücken als auch mit Zellen konnte ein die Progesteron-Abgabe stimulierender Effekt von FSH beobachtet werden. Wegen des in dem verwendeten FSH-Präparates (NIH S-6) enthaltenen LH-Anteils ist es jedoch nicht möglich den Grund für dieses Verhalten zu bestimmen. Weitere Versuche mit hochgereinigten FSH sind nötig, um dieses Phänomen zu klären. Auch die im Corpus luteum Zellversuch gezeigte stimulierende Wirkung von FSH auf die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Abgabe kann aus diesem Grund nicht näher spezifiziert werden. Zwar zeigt sich eine Zunahme in der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Akkumulation im Medium auch nach Zusatz steigender LH-Mengen, aber eine eindeutige Erhöhung der Freisetzung war nur nach FSH-Zusatz zu beobachten.

Ein Hinweis in Richtung der geäußerten Vermutung, wonach vor allem jüngere Corpora lutea auf FSH-Zusatz reagieren, kommt von MANN & NISWENDER (1983). Sie fanden im Corpus luteum des Rindes und hier vermehrt in der Anbildungsphase FSH-Rezeptoren.

Die hier gezeigten Ergebnisse (siehe 4.3 und 5.2.4) lassen die Vermutung zu, daß FSH in vitro auf die Ocytocinfreisetzung von Corpora lutea, die in ihrer Entwicklung noch nicht so weit fortgeschritten sind, eine stimulierende Wirkung zeigen kann. Ältere Corpora lutea sind möglicherweise refraktär gegen FSH.

VELDHUIS et al. (1982) beobachteten in ihrer Arbeit mit Schweinegranulosazellen einen stimulierenden Einfluß von LH auf die Prostacyclinfreisetzung. Auch HENDERSON & McNATTY (1977) konnten bei Granulosazellen des Menschen eine Beziehung zwischen Gonadotropinen und Prostaglandinen nachweisen.

PATE & CONDON (1982) und STOCK (1984) fanden keine dosisabhängige Steigerung der Progesteronsekretion durch LH bei mit Serum inkubierten Corpus luteum Zellkulturen. Bei den in diesen Versuchen verwendeten Zellsuspensionen konnte in der Kurzzeitinkubation (4 h) ein dosisabhängiger Effekt von LH gezeigt werden. Auch dies ist ein Hinweis auf die unterschiedliche Reaktivität von Corpus luteum Zellverbänden und Einzelzellen. Corpus luteum Gewebestücke wurden nicht mit LH-Zusatz untersucht.

Die Progesteronabgabe an das Medium wird durch E_2 -17 β beeinflusst. Hohe Dosen von Östradiol-17 β zeigten einen hemmenden Einfluß auf die Progesteronsynthese von Corpus luteum Zellen. FORTUNE & HANSEL (1979) und FORTUNE & VINCENT (1983) zeigten, daß die Progesteron-Produktion durch Granulosa- und Thekazellen beim Rind durch Östradiol-17 β in dosisabhängiger Weise gehemmt wird. Auch bei Corpus luteum Zellen scheint dieses Wirkungsprinzip noch zu greifen.

HIXON et al. (1983) wiesen auf eine luteolytische Interaktion zwischen Östradiol-benzoat und $PGF_{2\alpha}$ hin.

Durch das in hohen Dosen den Zellen zugesetzte E_2 -17 β kam es nicht nur zu einem Progesteron-Abfall, sondern auch zu einer verminderten $PGF_{2\alpha}$ -Freisetzung. Möglicherweise ist dies als Versuch der Gelbkörper-Zellen, der Luteolyse gegenzusteuern, anzusehen.

Durch ein einfaches Rechenexempel soll wahrscheinlich gemacht werden, daß in den vorgestellten Versuchen tatsächlich Ocytocin durch Corpus luteum Gewebe synthetisiert wurde. Für die Berechnung werden die bei den Inkubationsversuchen mit Corpus luteum Gewebestückchen gefundenen Werte zugrunde gelegt.

Setzt man voraus, daß ein mg Corpus luteum Gewebe in der mittleren Lutealphase in 24 h 3 ng Ocytocin freisetzt (ein Wert der in den meisten Fällen erreicht und in vielen sogar weit überschritten wird) und legt man das in Tabelle 6 für dieses Stadium ermittelte Durchschnittsgewicht von 4.7 g zu Grunde, so würde dies heißen, daß im Gelbkörper zum Zeitpunkt der Gewinnung 14 µg Ocytocin (3 µg/g Naßgewicht) vorliegen müßten, damit die inkubierte Probe die oben angegebene Menge freisetzen kann. Von uns wurden mit der Äthanolextraktion aber nur 0.3 µg/g Naßgewicht gefunden (Die durchschnittliche Wiederfindung von 70 % ist dabei nicht berücksichtigt).

Selbst wenn man die von WATHES et al. (1984) gefundenen Werte, die um mehr als den Faktor 5 höher liegen berücksichtigt, kann man damit noch nicht die im Medium gefundenen Konzentrationen erklären. Sie geben für Corpora lutea (Tag 5 - 10) durchschnittlich 1,77 µg/g Naßgewicht an und dieser Wert liegt immer noch deutlich unter den oben angegebenen 3 µg/g. Die höchste von diesen Autoren gefundene Konzentration war 18,5 ug/Corpus luteum. Die höchste von uns gemessene Freisetzung von Corpus luteum Gewebestücken war 6 ng/g Naßgewicht, was in diesem Fall einem Gesamtocytoicingehalt im Corpus luteum von fast 30 µg entsprechen würde.

Im Übrigen glauben wir, daß der Ocytoicingehalt in den von uns untersuchten Proben tatsächlich niedriger liegt.

Somit wird postuliert, daß das Corpus luteum des Rindes in der Lage ist, Ocytocin in vitro de novo zu synthetisieren.

Einen bedeutenden Hinweis auf die Existenz einer lokalen Ocytocinsynthese im bovinen Corpus luteum lieferten auch kürzlich IVELL & RICHTER (1984) im Rahmen von Genuntersuchungen. Während bis dato die Genexpression für das Ocytocin- und Vasopressin-Gen nur im Hypothalamus bekannt war, konnten die Autoren nachweisen, daß zumindest das Ocytocin-Gen während der mittleren Lutealphase im Rindergelbkörper in hoher Rate transskribiert wird. Sowohl luteale cDNA-Sequenz-Analyse, als auch zellunabhängige Translationsstudien zeigten, daß die luteale mRNA im wesentlichen der des Hypothalamus gleicht. Vergleicht man die absoluten Mengen pro Organ, erhält man für das aktive Corpus luteum eine ca. 250 mal höhere Ocytocin-mRNA Produktion als für einen einzelnen Hypothalamus.

Da in allen Versuchen keine wirklich eindeutigen, die Ocytocinfreisetzung beeinflussenden Faktoren gefunden werden konnten, bleibt die Frage weiterhin offen, durch welche Mechanismen die Regulation dieses Hormons im Gelbkörper des Rindes erfolgt. Eine Reihe von Substanzen wurde bisher noch nicht untersucht. So könnten Katecholamine, von denen bei einigen Spezies ein Einfluß auf die Steroidsynthese bekannt ist (Schaf: JORDAN III et al., 1978; Rind: CONDON & BLACK, 1976), eine Bedeutung haben. Noch nicht erforscht wurde bisher auch, ob eine Beziehung zwischen Ocytocin und den Endorphinen besteht. Nach den Ergebnissen ist auch nicht auszuschließen, daß parakrine Mechanismen an der Kontrolle des ovariellen Ocytocins beteiligt sind. Auch eine neurogene Beeinflussung wäre denkbar. So gibt es z.B. sehr viele sympathische Nervenendigungen im Ovar (BURDEN & LAWRENCE, 1980).

Für die weitere Erforschung des Ocytocins im Corpus luteum des Rindes bedarf es noch einer Reihe von Versuchen. So muß noch genauer der Einfluß des Zyklusstandes auf die Ocytocin-freisetzung geklärt werden.

Ein weiterer Aspekt ist die Trennung der Gesamtzell-population in große und kleine Luteinzellen und deren Fähigkeit, Ocytocin zu synthetisieren.

Näher untersucht werden sollte in diesem Zusammenhang auch noch der Zeitpunkt der Umwandlung des Follikels in den Gelb-körper, die zum Zeitpunkt der Luteinisierung auftretenden Veränderungen, sowie die dafür notwendigen Voraussetzungen.

Auch die Rolle verschiedener Hormone in Kombination miteinander, sowie deren dabei möglicherweise synergistisches Zusammenwirken in der Beeinflussung der Corpus luteum Funktion in Bezug auf die Ocytocinabgabe (Synthese) ist ein weites bisher noch wenig untersuchtes Feld.

Die immer mehr in den Fordergrund rückende Ansicht, daß die Regulierung endokriner Funktionen durch dynamische, sich wechselseitig beeinflussende Vorgänge bewerkstelligt wird, zeigt die Schwierigkeiten der zukünftigen Forschungsrichtung auf. Wie zum Beispiel die in den Versuchen mit Prostaglandinen erhaltenen Resultate zeigen, besteht vermutlich ein komplexes System sich wechselseitig beeinflussender Faktoren. Um diese Vorgänge genauer untersuchen zu können, ist es von großer Bedeutung, Teilaspekte davon in Modellen simulieren zu können. Bereits diese Erfassung im Detail ist jedoch schwierig durchzuführen. Wesentlich komplizierter ist es sicherlich diese Vorgänge in vivo zu untersuchen. Aus diesem Grund wird das in vitro Modell in Zukunft neben den Versuchen am Tier, die immer zur endgültigen Abklärung notwendig sind, sicherlich an Bedeutung gewinnen.

V ZUSAMMENFASSUNG

1 Ocytocin in Gewebeextrakten des Rindes

Der Ocytocingehalt in Äthanolextrakten von Prostata, Samenblasendrüse, Hoden, Nebenniere und Corpus luteum wurde untersucht.

In der Prostata und der Samenblasendrüse wurde die untere Nachweisgrenze (5 pg Ocytocin / g Naßgewicht) nicht überschritten. Der Ocytocingehalt im Hoden lag im Durchschnitt bei 53 pg / g Naßgewicht (s: 23.6 pg).

In Nebennieren betrug die mittlere Ocytocinkonzentration bei männlichen und weiblichen Tieren 91 bzw. 100 pg / g Naßgewicht. Während die Einzelwerte bei Bullen kaum eine Streuung aufwiesen (s: 3.9 pg), war bei Kühen eine große Varianz zu beobachten (s: 71 pg). Die Auftrennung der Nebenniere in Mark (NNM) und Rinde (NNR) brachte für das NNM (585 pg / g Naßgewicht, s: 235 pg) nahezu zehnmal so hohe Werte wie für die NNR (59 pg / g Naßgewicht, s: 27 pg).

In Corpus luteum Extrakten zeigte sich eine enge Beziehung des Ocytocingehaltes zum Zyklusstadium. Corpora lutea der Tage: 1-4, 5-7, 8-13 bzw. 14-20 enthielten jeweils (Mittelwert $\pm$ s) 37.8 ± 26.3 , 139 ± 80 , 313 ± 216 , bzw. 52 ± 66 ng Ocytocin / g Naßgewicht. In Corpora lutea graviditatis (3. - 6. Gestationsmonat) wurden die niedrigsten Durchschnittskonzentrationen gefunden (4.4 ng / g Naßgewicht ± 5.7 ng)

2 Ocytocin in der Follikelflüssigkeit und Ocytocinfreisetzung durch inkubierte Follikel beim Rind.

Von mehreren Gruppen nicht atretischer Follikel wurde der Ocytocingehalt in der Follikelflüssigkeit untersucht. Dabei zeigte sich keine Beziehung zwischen dem Durchmesser und der Ocytocinkonzentration / ml Flüssigkeit. Bedingt durch die Größenzunahme kommt es jedoch zu einem Anstieg der absoluten Ocytocinmenge in Follikel.

Bei auf Gitternetzen inkubierten ganzen Follikeln wurde bei zwei Gruppen (Medium mit Zusatz von Serum bzw. Medium mit Zusatz von BSA) eine Verdopplung der Ocytocinabgabe vom ersten auf den zweiten Tag beobachtet. Bei einer dritten ebenfalls mit Serum inkubierten Gruppe trat keine Änderung der Freisetzung auf.

Follikel, die im "Continuous Flux System" inkubiert wurden, gaben wesentlich mehr Ocytocin an das Inkubationsmedium ab. (Freisetzung / Follikel / 24 h ca. 1.7 ng Ocytocin). Die ebenfalls untersuchten Progesteronwerte lassen die Vermutung zu, daß die Follikel in diesem Versuchsaufbau luteinisiert wurden.

Die Inkubation von Theka- und Granulosazellen zeigte, daß von beiden Geweben Ocytocin freigesetzt wird. Die Ocytocinabgabe durch Granulosazellen (685 pg / mg Protein / 40 h, s: 231 pg) war etwa um den Faktor 15 höher als bei den Thekazellen (46 pg / mg Protein / 40 h, s: 8.4 pg). Der Unterschied in der Progesteronfreisetzung war dagegen viel geringer (Granulosaz.: 3.8 µg / mg Protein / 40 h, s: 0.9 µg; Thekaz.: 2.0 µg / mg Protein / 40 h, s: 0.6 µg)

Der Anstieg der Ocytocinkonzentration und die schließlich im Medium vorliegende große Menge lassen die Vermutung zu, daß Ocytocin im Follikel synthetisiert wird. Den Hauptanteil an dieser Produktion scheinen die Granulosazellen zu tragen.

3 Inkubationsversuche mit bovinen Corpus luteum Gewebe

Mit Fortschreiten der Inkubationsdauer kommt es bei Gewebestücken und Zellen zu einer Zunahme der an das Medium abgegebenen Menge an Ocytocin, Progesteron und $\text{PGF}_{2\alpha}$.

In der Mehrzahl der Fälle setzten junge Corpora lutea mehr Ocytocin frei, als ältere.

Ein Vergleich der in Corpus luteum Extrakten gefundenen Ocytocinkonzentrationen mit den im Medium akkumulierten Ocytocinmengen zeigt, daß wahrscheinlich eine lokale Synthese dieses Hormons angenommen werden kann.

Der möglicherweise vermindernde Einfluß von Östradiol-17 β (E_2 -17 β) auf die Ocytocinabgabe wurde nur bei Gewebestücken beobachtet. Auch bei anderen Zusätzen (Prostaglandine) erhaltene Ergebnisse deuten auf einen Einfluß der Gewebsintegrität auf das in vitro Verhalten nicht nur in Bezug auf Ocytocin, sondern auch in Bezug auf Progesteron und $\text{PGF}_{2\alpha}$ hin.

So wurde die Progesteronfreisetzung durch Zusatz von E_2 -17 β nur bei Zellen, nicht aber bei Gewebestücken gehemmt.

Fördernd auf die Progesteronfreisetzung wirken hCG, FSH (NIH - S6) und LH (NIH - B8; nur bei Zellen untersucht). Die Wirkung von FSH kann auch auf den in diesem Präparat enthaltenen LH-Anteil zurückzuführen sein. PGI_2 und PGE_2 erhöhten die Progesteronabgabe durch Gewebestücke, nicht aber durch Zellen.

Die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Akkumulation im Medium wurde in beiden Gruppen durch PGE_2 erhöht. FSH (NIH - S6) stimuliert die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Abgabe nur durch Zellen. Auch hier gilt ebenfalls die oben gemachte Einschränkung, daß diese Wirkung wegen des verwendeten Präparats nicht eindeutig dem FSH zugeschrieben werden kann. Der Prostaglandin-Synthetasehemmer Indomethazin konnte bei Gewebestücken die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Freisetzung verhindern. Dies weist darauf hin, daß an das Medium abgegebenes $\text{PGF}_{2\alpha}$

in vitro synthetisiert wird. Bei Hemmung der Prostaglandin-neusynthese durch Gewebestücke mit Indomethazin wird zugegebenes PGE_2 in $\text{PGF}_{2\alpha}$ umgewandelt. Auch bei Zellen konnte nach PGE_2 -Zusatz ein Anstieg in der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentration im Medium beobachtet werden.

VI SUMMARY

IN VITRO STUDIES ON OXYTOCIN IN BOVINE STEROIDOGENIC TISSUE

1 Oxytocin in Bovine Tissue Extracts

The amount of oxytocin in ethanol extracts of prostata, seminal gland, testis, adrenal gland and corpus luteum was investigated. Oxytocin in prostata and seminal gland was under the limit of detection (5 pg oxytocin/g wet wt.). Testis contained an average of 53 pg/g wet wt. (SD: 23.6pg).

The mean concentration of oxytocin in adrenal glands of male and female animals was 91 and 100 pg/g wet wt. respectively. The values measured in bulls were similar (SD: 3.9 pg). In contrary there was a great variance in cows (SD: 71 pg). After separating the cortex and the medulla of the adrenal gland, the mean concentration of oxytocin in the medulla (585 pg/g wet wt., SD: 235 pg) was found to be nearly ten times as high as in the cortex (59 pg/g wet wt., SD: 27 pg).

There was a close relation between the amount of oxytocin in corpus luteum extracts and the stage of cycle. Corpora lutea of the days: 1-4, 5-7, 8-13, and 14-20 contained (mean $\pm$ SD) 37.8 $\pm$ 26.3, 139 $\pm$ 80, 313 $\pm$ 216 and 52 $\pm$ 66 ng oxytocin/g wet wt. respectively. Mean concentration of oxytocin was found to be lowest in corpora lutea graviditatis (4.4 ng/g wet wt. $\pm$ 5.7 ng, 3.-6. month of gestation).

2 Oxytocin in Follicular Fluid and Release of Oxytocin by Incubated Follicles of the Cow

In several groups of non atretic follicles the amount of oxytocin in the follicular fluid was measured. No relation between the diameter and the concentration of oxytocin/ml was found. Together with the increase of size an increase of the total amount of oxytocin per follicle was measured.

Two groups of follicles (medium with serum or medium with BSA) cultured on grids, released about twice the amount of oxytocin on day two of incubation compared with day one. No alteration of the amount of oxytocin accumulated in the medium (with serum) could be observed in a third group. Follicles incubated in a continuous flux system released substantially higher amounts of oxytocin (oxytocin/follicle /24 h - 1.7 ng) Values of progesterone which were also measured in this experiment suggest, that the follicles have been luteinized in this system.

When incubating theca and granulosa cells, both tissues were found to release oxytocin. The amount of oxytocin accumulated in the medium by granulosa cells (685 pg/mg protein/40 h , SD: 231 pg) was about 15 times that of theca cells (46 pg/mg protein/40 h, SD: 8.4 pg), whereas the difference in the progesterone production was only minor (granulosa cells: 3.8 μ g/mg protein/40 h, SD: 0.9 μ g; theca cells: 2.0 μ g/mg protein/40 h, SD: 0.6 μ g). The increase of the oxytocin concentration, together with the the finally high level found in the medium suggest, that oxytocin might be synthesized in the follicle. The greater part to this production seems to be contributed by the granulosa cells.

3 In Vitro Studies with Bovine Luteal Tissue

With the proceeding of the incubation time an increase of the amount of oxytocin, progesterone and $\text{PGF}_{2\alpha}$ set free by tissue slices and cells was found. The release of oxytocin in most cases was higher in younger corpora lutea than in older ones.

A comparison between the concentration of oxytocin found in corpus luteum extracts and the amount of oxytocin accumulated in the medium suggests, that there is a local production of this hormone.

The possibly inhibitory effect of oestradiol-17 β (E_2 -17 β) on the accumulation of oxytocin only could be watched in tissue slices. Results obtained after addition of other hormones (prostaglandins) also indicate, that the integrity retained by tissue slices seems to have an influence on the in vitro reaction not only in respect to oxytocin but also to progesterone and $\text{PGF}_{2\alpha}$.

E_2 -17 β inhibited the release of progesterone by cells but not by tissue slices. HCG, FSH (NIH-S6), and LH (NIH-B8) stimulated the release of progesterone. Probably the effect of FSH could be due to the LH-content of this preparation. PGI_2 and PGE_2 had a similar effect only in tissue slices but not in cells.

$\text{PGF}_{2\alpha}$ -accumulation in the medium was increased by PGE_2 in both groups. FSH (NIH-S6) stimulated the $\text{PGF}_{2\alpha}$ -release only when added to cells (with the limitation because of the used preparation mentioned above). Addition of the prostaglandin-synthetase-inhibitor indomethazin inhibited $\text{PGF}_{2\alpha}$ -release of tissue slices almost completely. This indicates, that $\text{PGF}_{2\alpha}$ accumulated in the medium is synthesized in vitro. When blocking the de novo formation of prostaglandins with indomethazin, PGE_2 added to the medium is transformed into $\text{PGF}_{2\alpha}$. Also in incubations with cells an increase in the $\text{PGF}_{2\alpha}$ concentration was visible after addition of PGE_2 .

VII LITERATURVERZEICHNIS

- ADASHI, E.Y. & HSUEH, A.J.W. (1981)
Direct inhibition of testicular androgen biosynthesis
revealing antagonadal activity of neurohypophysial
hormones
Nature, Lond. 293, 650 - 652
- ANG, V.T. & JENKINS, J.S. (1984)
Neurohypophysial hormones in the adrenal medulla
J. Clin. Endocrinol. Metabol. 58, 688 - 691
- ARMSTRONG, D.T. & HANSEL, W. (1959)
Alteration of the bovine estrous cycle with oxytocin
J. Dairy Sci. 42, 533 - 542
- ARMSTRONG, D.T. & BLACK, D.L. (1966)
Influence of LH on corpus luteum metabolism and
progesterone-biosynthesis throughout the bovine estrous
cycle
Endocrinol. 78, 937 - 944
- BAUMANN, G. (1980)
Einfluß von Paarungsverhalten und Stimulation der
Genitalorgane auf die Freisetzung von Oxytocin beim
Rind
Diss. Med. Vet. Univ. München
- BREITINGER, H.-J. (1984)
Sekretionsmuster von ovariellen Oxytocin im Zyklus und
nach Hysterektomie sowie Versuche zum Einfluß von
Oxytocin-Antikörpern auf den Zyklus beim Rind
Diss. Med. Vet. Univ. München

- BRINKLEY, H.J. & NALBANDOV, A.V. (1963)
Effect of oxytocin on ovulation in rabbits and rats
Endocrinol. 73, 512 - 517
- BULLERMANN, B. (1984)
Zyklusabhängige Oxytocinfreisetzung beim Rind unter
besonderer Berücksichtigung der ovariellen Sekretion
Diss. Med. Vet. Univ. München
- BURDEN, H.W. & LAWRENCE JR., I.E. (1980)
Nerve supply of the ovary
In: Biology of the Ovary, Nijhoff, 99 - 105
- CARLSON, J. & BLACK, D.L. (1969)
Oxytocin-produced changes in the bovine ovary before
and after unilateral ovariectomy
J. Reprod. Fert. 20, 39 - 43
- CONDON, W.A. & BLACK, D.L. (1976)
Catecholamine-induced stimulation of progesterone by
the bovine corpus luteum in vitro
Biol. Reprod. 15, 573 - 578
- DIELEMAN, S.J., KRUIP, T.A.M., FONTIJNE, P., DE JONG,
W.H.R. & VAN DER WEYDEN, G.C. (1983)
Changes in oestradiol, progesterone and testosterone
concentrations in follicular fluid and in the micro-
morphology of preovulatory bovine follicles relative to
the peak of luteinizing hormone
J. Endocr. 97, 31 - 42
- DONALDSON, L. & HANSEL, W. (1965)
Histological study of bovine corpora lutea
J. Dairy Sci. 48, 905 - 909

DONOVAN, B.T. (1961)

The role of the uterus in the regulation of the oestrus cycle

J. Reprod. Fert. 2, 508 - 510

DUNCAN, G.W., BOWERMAN, A.M., HEARN, W.R. &

MELAMPY, R.M. (1960)

In vitro synthesis of progesterone by swine corpora lutea

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104, 17

DUNCAN, G.W., BOWERMAN, A.M., ANDERSON, L.L., HEARN, W.R. &

MELAMPY, R.M. (1961)

Factors influencing in vitro synthesis of progesteron

Endocrinol. 68, 199 - 207

EDER, M. & GEDIK, P. (1984)

Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie

Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo

EINER-JENSEN, N. & McCracken, J.A. (1976)

Krypton measurement of capillary blood flow in the ovine corpus luteum during PGF₂ induced luteolysis

In: Rec. Adv. in Prostaglandine and Thromboxane Research, Raven, New York, Vol. 2, 901

ENZENHÖFER, G. (1984)

Analytische Untersuchungen über die primären Prostaglandine F_{2α} und E₂ und ihre 13,14-dihydro-15-keto-Metaboliten im Zyklus des Rindes

Diss. Med. Vet. Univ. München

- ESPEY, L.L. (1978)
Ovarian contractility and its relationship to ovulation
- A review
Biol. Reprod. 19, 540 - 551
- FIELDS, M.J., FIELDS, P.A., CASTRO-HERNANDEZ, A. &
LARKIN, L.H. (1980)
Evidence for relaxin in corpora lutea of late pregnant
cows
Endocrinol. 107, 869 - 876
- FIELDS, P.A., ELDRIDGE, R.K., FUCHS, A.-R., ROBERTS, R.F. &
FIELDS, M.J. (1983)
Human placental and bovine corpora luteal oxytocin
Endocrinol. 112, 1544 - 1546
- FITZ, T.A., MAYAN, M.H., SAWYER, H.R. &
NISWENDER, G.D. (1982)
Characterization of two steroidogenic cell types in the
ovine corpus luteum
Biol. Reprod. 27, 703 - 711
- FJELLSTRÖM, D., KIHLSRÖM, J.E. & MELIN, P. (1968)
The effect of synthetic oxytocin upon seminal
characteristics and sexual behaviour in male rabbits
J. Reprod. Fert. 17, 207 - 209
- FLETCHER, P.L. & NISWENDER, G.D. (1982)
Effect of PGF_{2α} on progesterone secretion and adenylate
cyclase activity in ovine luteal tissue
Prostaglandins 23, 803 - 818
- FLINT, A.P.F. & SHELDRIK, E.L. (1982)
Ovarian secretion of oxytocin is stimulated by
prostaglandin
Nature, Lond. 297, 587 - 588

- FLINT, A.P.F. & SHELDRIK, E.L. (1983)
 Evidence for a systemic role for ovarian oxytocin in
 luteal regression in sheep
 J. Reprod. Fert. 67, 215 - 225
- FORTUNE, J.E. & HANSEL, W. (1979)
 The effect of 17- β estradiol on progesterone secretion
 by bovine theca and granulosa cells
 Endocrinol. 104, 1834 - 1838
- FORTUNE, J.E. & VINCENT, S.E. (1983)
 Progesterone inhibits the induction of aromatase
 activity in rat granulosa cells in vitro
 Biol. Reprod. 28, 1078 - 1089
- GAVIN, W. (1913)
 On the effect of administration of extracts of
 pituitary body and corpus luteum on to milk cows
 Q. J. Exp. Physiol. 6, 13 - 16
- GOREWIT, R.C., (1979)
 Method for determinig oxytocin concentrations in unex-
 tracted sera; characterisation in lactating cattle
 Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 160, 80 - 87
- GOSPODAROWICZ, D. & GOSPODAROWICZ, F. (1972)
 A technique for the isolation of bovine luteal cells
 and its application to metabolic studies of luteal
 cells in vitro
 Endocrinol. 90, 1427 - 1434
- GULDENAAR, S.E.F., WATHES, D.C., PICKERING, B.T. (1984)
 Immunocytochemical evidence for the presence of
 oxytocin and neurophysin in the bovine corpus luteum
 Cell Tissue Res. 237, 349 - 352

- HABERMEHL, K.-H. (1975)
 Die Altersbestimmung bei Haus- und Labortieren
 Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
- HALKERSTON, I.D.K. & FEINSTEIN, M. (1968)
 Preparation of ACTH responsive isolated cells from rat adrenals
 Fed. Proc. 27, 626 (abstract)
- HALKERSTON, I.D.K., FEINSTEIN, M. & HECHTER, O. (1968)
 Effect of lytic enzymes upon the responsivity of rat adrenals in vitro. I. Effect of trypsin upon the steroidogenic action of reduced triphosphopyridine nucleotide
 Endocrinol. 83, 61 - 73
- HAMBERGER, L., NILSSON, L., DENNEFORS, B., KHAN, I. & SJÖGREN, A. (1979)
 Cyclic AMP formation of isolated human corpora lutea in response to HCG-interference by $\text{PGF}_{2\alpha}$
 Prostaglandins 17, 615 - 621
- HANSEL, W., CONCANNON, P.W. & LUKASZEWSKA, J.H. (1973)
 Corpora lutea of the large domestic animals
 Biol. Reprod. 8, 222 - 245
- HENDERSON, K.M. & McNATTY, K.P. (1977)
 A possible interrelationship between gonadotropin stimulation and $\text{PGF}_{2\alpha}$ inhibition of steroidogenesis by granulosa-luteal cells in vitro
 J. Endocr. 73, 71 - 78
- HENDERSON, K.M. & MOON, Y.S. (1979)
 Luteinization of bovine granulosa cells and corpus luteum formation associated with loss of androgen-aromatizing ability
 J. Reprod. Fert. 56, 89 - 97

- HENSBY, C.N. (1974)
Reduction of prostaglandin E_2 to $PGF_{2\alpha}$ by an enzyme in sheep blood
Biochem. Biophys. Acta 83, 145 - 154
- HIXON, J.E., PIMENTEL, C.A., WESTON, P.G., CHAFETZ, E.P., SHANKS, R.D. & HANSEL, W. (1983)
A luteolytic interaction between estradiol-benzoate and $PGF_{2\alpha}$ in cattle
J. Anim. Sci. 56, 1190 - 1197
- HOFFMANN, B., KYREIN, H.J. & ENDER, M.L. (1973)
An efficient procedure for the determination of progesterone by radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma
Hormone Research 4, 302 - 310
- HOPPEN, H. O. (1982)
Endokrinologie des Kindes- und Jugendalters
Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1975)
The nomenclature of peptide hormones.
Recommendations, 1974
Eur. J. Biochem. 55, 485 - 486
- IVELL, R. & RICHTER, D. (1984)
The gene for the hypothalamic peptide hormone oxytocin is highly expressed in the bovine corpus luteum: biosynthesis, structure and sequence analysis
The EMBO Journal Vol. 3 No. 10 in Druck
- JORDAN III, A.W., CAFFREY, J.L. & NISWENDER, G.D. (1978)
Catecholamine-induced stimulation of progesterone and 3^5 -AMP production by dispersed ovine luteal cells
Endocrinol. 103, 385 - 392

- KALTENBACH, C.C., COOK, B., NISWENDER, G.D. & NALBANDOV, A.V. (1966)
Progesterone synthesis by ovine luteal tissue in vitro
J. Anim. Sci. 25, 926
- KARLSON, P. (1980)
Kurzes Lehrbuch der Biochemie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- KAWAKAMI, M., KUBO, K., UEMURA, T., NAGASE, M. & HAYASHI, R. (1981)
Involvement of ovarian innervation in steroid secretion
Endocrinol. 109, 136 - 145
- KHAN-DAWOOD, F.S. & DAWOOD, M.Y. (1983)
Human ovaries contain immunoreactive oxytocin
J. Clin. Endocrinol. Metab. 57, 1129 - 1132
- KLOPPENBURG, P.W.C., ISLAND, D.P., LIDDLE, G.W., MICHAELIS, A.M. & NICHOLSON, W.E. (1968)
A method of preparing adrenal cell suspensions and its application to the in vitro study of adrenal metabolism
Endocrinol. 83, 1053 - 1058
- KRUIP, T.A.M. (1984)
Unveröffentlicht, persönliche Mitteilung
- KRUIP, T.A.M. & DIELEMAN, S.J. (1982)
Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures
Reprod. Nutr. Develop. 22, 465 - 473
- KRUIP, T.A.M. & DIELEMAN, S.J. (1983)
Steroidhormonproduktion in vitro durch Ovarfollikel
Wiener Tierärztliche Monatsschrift 6/7, 203 - 206

- LAHLOU-KASSI, A., SCHAMS, D. & GLATZEL, P. (1984)
Plasma gonadotropin concentrations during the oestrous cycle and after ovariectomy in two breeds of sheep with low and high fecundity
J. Reprod. Fert. 70, 165 - 173
- MACKENZIE, K. (1911)
An experimental investigation of the mechanism of milk secretion with special reference to the action of animal extracts
Q. J. Exp. Physiol. 4, 305 - 330
- McCRACKEN, J.A., CARLSON, J.C., GLEW, M.E., GODING, J.R., BAIRD, D.T., GREEN, K. & SAMUELSSON, B. (1972)
PGF_{2α} identified as a luteolytic hormone in sheep
Nature, Lond. 238, 129 - 134
- McCRACKEN, J.A. (1984)
Update on luteolysis - Receptor regulation of pulsatile secretion of PGF_{2α} from the uterus
Res. Reprod., 1 - 2
- McCRACKEN, J.A., GLEW, M.E. & SCARAMUZZI, A.M. (1970)
Corpus luteum regression induced by PGF_{2α}
J. Clin. Endocr. Metab. 30, 544 - 546
- McDOUGALL, A.N., WALKER, F.M.M. & WATSON, J. (1977)
The effect of cloprostenol on human luteal steroid and prostaglandin secretion in vitro
Br. J. Pharmac. 60, 425 - 431
- McNATTY, K.P., HEATH, D.A., LUN, S., FANNIN, J.M., McDIARMID, J.M. & HENDERSON, K.M. (1984)
Steroidogenesis by bovine theca interna in an in vitro perfusion system
Biol. Reprod. 30, 159 - 170

MAEYAMA, M., SAITA, B., ICHIHARA, K., MUNEMURA, M. & MORI, N. (1976)

Effects of PGE_2 on adenosine-3`5-monophosphate accumulation and progesterone synthesis in human corpora lutea in vitro

J. Steroid Biochem. 7, 295 - 300

MANN, J.G. & NISWENDER, G.D. (1983)

FSH-receptors in the bovine corpus luteum

J. Anim. Sci. 57, Suppl. 1, Abstr. 536

MARSH, J. (1970)

The stimulatory effect of PGE_2 on adenylyl-cyclase in bovine corpora lutea

Febs Letters 7, 283 - 286

MARSH, J. (1971)

The effect of prostaglandin on the adenylyl-cyclase of the bovine corpus luteum

Ann. N.Y. Acad. Sci. 180, 416 - 425

MASON, R., MARSH, J. & SAVARD, K. (1962)

The action of gonadotropin in vitro

J. Biol. Chem. 237, 1801 - 1805

MEYER, H.H.D., SCHALLENBERGER, E. & ENZENHÖFER, G. (1984)

13,14 dihydro-15-ketoprostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ determination in plasma of post partum cows to monitor $\text{PGF}_{2\alpha}$ secretion

Acta endocr., Copenh. Suppl. 264, 72 - 73

MILVAE, R.A. & HANSEL, W. (1983 a)

Luteolytic effect of 13,14-dihydro- $\text{PGF}_{2\alpha}$ in heifers

J. Reprod. Fert. 67, 203 - 207

- MILVAE, R.A. & HANSEL, W. (1983 b)
Prostacyclin, prostaglandin $F_{2\alpha}$ and progesterone
production by bovine luteal cells during the estrous
cycle
Biol. Reprod. 29, 1063 - 1068
- MOODY, E.L. & HANSEL, W. (1971)
Effect of pretreating heifers with human chorionic
gonadotropin and estradiol on subsequent in vitro
luteal tissue progesterone biosynthesis
J. Anim. Sci. 33, 1032
- MOOR, R.M., HAY, M.F. & SEAMARK, R.F. (1975)
The sheep ovary: Regulation of steroidogenic, haemo-
dynamic and structural changes in the largest follicle
and adjacent tissue before ovulation
J. Reprod. Fert. 45, 595 - 604
- MOOR, R.M. (1977)
Sites of steroid production in ovine graafian follicles
in culture
J. Endocr. 73, 143 - 150
- MOSS, S., WRENN, T.R. & SYKES, J.F. (1954)
Some histological and histochemical observations of the
bovine ovary during the estrous cycle
Anat. Res. 120, 409 - 434
- NEELY, D.P., STABENFELD, G.H. & SAUTER, C.L. (1979)
The effect of exogenous oxytocin on luteal function in
mares
J. Reprod. Fert. 55, 303 - 308

NICHOLSON, H.D., SWANN, R.W., BURRFORD, G.D., WATHES, D.C.,
PORTER, D.G. & PICKERING, B.T. (1984)

Identification of oxytocin and vasopressin in the
testis and in adrenal tissue

Regulatory Peptides 8, 141 - 146

NICHOLSON, H.D., SWANN, R.W., BURRFORD, G.D., WATHES, D.C.
PORTER, D.G. & PICKERING, B.T. (1983)

More steroidogenic tissue containing oxytocin and
vasopressin: human testis and fetal adrenal

Acta endocr., Copenh. Suppl. 256, 243, Abstr.

NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE (1975)

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere

Band II, Eingeweide,

Band IV, Nervensystem, Sinnesorgane,

Endokrine Drüsen

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

NISWENDER, G.D., DIEKMAN, M.A., NETT, T.M. &
AKBOR, A.M. (1973)

Relative blood flow to the ovaries of cycling and
pregnant ewes

Biol. Reprod. 9, 87

O'GRADY, J.P., KAHORU, E.J., GLASS, R.A., CALDWELL, B.V.,
BROCK, W.A. & SPEROFF, L. (1972)

Inhibition of progesteron synthesis in vitro by
prostaglandin F_{2α}

J. Reprod. Fert. 30, 153 - 156

OKUDA, K. (1982)

Morphologische und endokrinologische Untersuchungen am
Corpus luteum periodicum und graviditatis des Rindes

Diss. Med. Vet. Univ. München

- OTT, I. & SCOTT, J.C. (1910 a)
The action of infundibulum upon the mammary secretion
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 8, 49
- OTT, I. & SCOTT, J.C. (1910 b)
The galactagogue action of the thymus and corpus luteum
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 8, 49
- PATE, J.L. & CONDON, W.A. (1982)
Effects of serum and lipoproteins on steroidogenesis in
cultured bovine luteal cells
Mol. Cell. Endocr. 28, 551 - 562
- PHARRIS, B.B., CORNETTE, J.C. & GUTKNECHT, G.D. (1970)
Vascular control of luteal steroidogenesis
J. Reprod. Fert. Suppl. 10, 97 - 103
- FRIEDKALNS, J., WEBER, A.F. & ZEMJANIS, R. (1968)
Qualitative and quantitative morphological studies of
the cells of the membrana granulosa, theca interna and
corpus luteum of the bovine ovary
Zschr. Zellforschung 85, 501 - 520
- REYNOLDS, L.P., ROBERTSON, D.A. & FORD, S.P. (1982)
Effect of intrauterine infusion of oestradiol-17 β and
prostaglandin E₂ on luteal function in non-pregnant
heifers
J. Reprod. Fert. 69, 703 - 709
- RICHARDSON, M. & MASSON, G.M. (1980)
Progesterone production by dispersed cells from human
corpora lutea; stimulation by gonadotropins and PGF_{2 α} ;
lack of response to adrenaline and isoprenaline
J. Endocr. 87, 247 - 254

- RIGOR, E.M. & CLEMENTE, R.R. (1964)
The effect of oxytocin injections on the oestrous cycle
of gilts
5. Congr. Intern. Reprod. Anim., Trento, 3, 364 - 366
- RODGERS, R.J., O'SHEA, J.D. & FINDLAY, J.K. (1983 a)
Progesterone production in vitro by small and large
ovine luteal cells
J. Reprod. Fert. 69, 113 - 124
- RODGERS, R.J., O'SHEA, J.D., FINDLAY, J.K., FLINT, A.P.F. &
SHELDRIK, E.L. (1983 b)
Large luteal cells the source of luteal oxytocin in the
sheep
Endocrinol. 113, 2302 - 2304
- SAVARD, K., MARSH, J.M. & RICE, B.F. (1965)
Gonadotropins and ovarian steroidogenesis
Rec. Prog. Hormone Res. 21, 285 - 356
- SAWYER, H.R., ABEL JR., J.H., McCLELLAN, M.C., SCHMITZ, M. &
NISWENDER, G.D. (1979)
Secretory granules and progesterone secretion by ovine
corpora lutea in vitro
Endocrinol. 104, 476 - 486
- SAYERS, G., PORTANOVA, R., BEALL, R.J., SEELIG, S. &
MALAMED, S. (1971)
Technics for the isolation of cells of the adrenal
cortex, the anterior pituitary and the corpus luteum:
Morphological and functional evaluation of the isolated
cells
Acta endocrinol. Copenh., Suppl. 153, 11 - 26

SCHÄFER, E. A. (1913)

On the effect of pituitary and corpus luteum extracts
on the mammary gland in the human subject

Q. J. Exp. Physiol. 6, 17 - 19

SCHÄFER, E.A. & MACKENZIE, K. (1911)

The action of animal extracts on milk secretion

Proc. Royal Soc. Biol. 84, 16 - 22

SCHALLENBERGER, E., SCHAMS, D., BULLERMANN, B. & WALTERS,
D.L. (1984)

Pulsatile secretion of gonadotropins, ovarian steroids
and ovarian oxytocin during prostaglandin induced
regression of the corpus luteum in the cow

J. Reprod. Fert. 71, 493 - 501

SCHAMS, D., SCHMIDT-POLEX, B. & KRUSE, V. (1979)

Oxytocin determination by radioimmunoassay in cattle

Acta endocr., Copenh. 92, 258 - 270

SCHAMS, D., LAHLOU-KASSI, A. & GLATZEL, P. (1981)

Oxytocin concentrations in peripheral blood during the
estrous cycle and after ovariectomy in two breeds of
sheep with low and high fecundity

Acta endocr., Copenh. 96, Suppl. 240, 49 - 50 Abstract

SCHAMS, D. & KARG, H. (1982)

Hormonal response following treatment with different
prostaglandin-analogues for estrous cycle regulation in
cattle

Theriogenology 17, 499 - 513

SCHAMS, D., LAHLOU-KASSI, A. & GLATZEL, P. (1982)

Oxytocin concentrations in peripheral blood during the
oestrous cycle and after ovariectomy in two breeds of
sheep with high and low fecundity

J. Endocr. 92, 9 - 13

SCHAMS, D. (1983)

Oxytocin determination by radioimmunoassay

III. Improvement to subpicogram sensitivity and application to blood levels in cyclic cows

Acta endocr., Copenh. 103, 180 - 183

SCHAMS, D., PROKOPP, S. & BARTH, D. (1983)

The effect of active and passive immunization against oxytocin on ovarian cyclicity in ewes

Acta endocr., Copenh. 103, 337 - 344

SCHAMS, D., WALTERS, D.L., SCHALLENBERGER, E., BULLERMANN, B. & KARG, H. (1983)

Ovarian oxytocin in the cow

Acta endocr., Copenh. 102, Suppl. 253, 147

SCHAMS, D. & LAHLOU-KASSI, A. (1984)

Circulating concentrations of oxytocin during pregnancy in ewes

Acta endocr., Copenh. 106, 277 - 281

SCHAMS, D., SCHALLENBERGER, E., MEYER, H.H.D., BULLERMANN, B., BREITINGER, H.-J., ENZENHÖFER, G., KOLL, R., KRUIP, T.A.M., WALTERS, D.L. & KARG, H. (1984)

Ovarian oxytocin during the estrous cycle in cattle

7th Intern. Congr. Endocr. Quebec City Canada, Satellite Symposia "Oxytocin"

SCHAMS, D., SCHALLENBERGER, E. & LEGROS, J.J. (1984)

Evidence for the secretion of immunoreactive neurophysin I in addition to oxytocin from the ovary in cattle

J. Reprod. Fert. in Druck

SHARMA, O.P. & HAYS, R.L. (1976)

A possible role for oxytocin in sperm transport in the male rabbit

J. Endocr. 68, 43 - 47

SHELDRECK, E.L., MITCHELL, M.D. & FLINT, A.P.F. (1980)

Delayed luteal regression in ewes immunized against oxytocin

J. Reprod. Fert. 59, 37 - 42

SHELDRECK, E.L. & FLINT, A.P.F. (1981)

Circulating concentrations of oxytocin during the estrous cycle and early pregnancy in sheep

Prostaglandins 22, 631 - 636

SHEMESH, M., HANSEL, W. & CONCANON, P.W. (1975)

Testosterone synthesis in the bovine corpus luteum

Biol. Reprod. 13, 490 - 493

SOFRONIEW, M.V. (1983)

Vasopressin and oxytocin in the mammalian brain and spinal cord

Trends in Neuro Sciences 6, 467 - 472

STOCK, A. (1984)

Die Luteinzellkultur als Modell zur Untersuchung der Progesteronsekretion von Corpora lutea und Corpus luteum "Zysten" beim Rind

Diss. Med. Vet. Univ. München

SUAREZ-SATO, M. & LEGAULT-DEMARE, J. (1960)

Etude de l'activite biologique in vitro des hormones gonadotropes

Acta endocr., Copenh. 33, 444 - 450

- TAN, G.J.S., TWEEDALE, R. & BIGGS, J.S.G. (1982)
Effects of oxytocin on the bovine corpus luteum of
early pregnancy
J. Reprod. Fert. 66, 75 - 78
- TENNANT, J.R. (1964)
Evaluation of the trypan blue technique for the
determination of cell viability
Transplantation 2, 685 - 694
- THORBURN, G.D. & HALES, J.R.S. (1972)
Selective reduction in blood flow of the ovine corpus
luteum after infusion of PGF_{2α} into a uterine vein
Proc. Austral. Physiol. Pharmacol. Soc. 3, 145
- URSELY, J. & LEYMARIE, P. (1979)
Varying response to LH of two luteal cell types
isolated from bovine corpora lutea
J. Endocr. 83, 303 - 310
- VELDHUIS, J.D., KLASE, P. & DEMERS, L.M. (1982)
LH stimulates the prodction of prostacyclin by isolated
ovarian cells in vitro
Prostaglandins 23, 319 - 327
- WALTERS, D.L. & SCHALLENBERGER, E. (1982)
Pulsatile secretion of estradiol (E₂) and progesterone
(P₄) during the estrous cycle of the cow
J. Steroid Biochem. 17, Abstr. 270
- WALTERS, D.L. & SCHALLENBERGER, E. (1984)
Pulsatile secretion of gonadotropins, ovarian steroids
and ovarian oxytocin during the periovulatory phase of
the oestrous cycle in the cow
J. Reprod. Fert. 71, 503 - 512

- WALTERS. D.L., SCHAMS, D. & SCHALLENBERGER, E. (1984)
Pulsatile secretion of gonadotropins, ovarian steroids
and ovarian oxytocin during the luteal phase of the
oestrous cycle in the cow
J. Reprod. Fert. 71, 503 - 512
- WATHES, D.C. & SWANN, R.W. (1982)
Is oxytocin an ovarian hormone
Nature 207, 225 - 227
- WATHES, D.C., SWANN, R.W., PICKERING, B.T., PORTER, D.G.,
HULL, M.G.R. & DRIFE, J.O. (1982)
Neurohypophysial hormones in the human ovary
Lancet ii, 410 - 412
- WATHES, D.C., SWANN, R.W., BIRKETT, S.D., PORTER, D.G. &
PICKERING, B.T. (1983 a)
Characterization of oxytocin, vasopressin and neuro-
physin from the bovine corpus luteum
Endocrinol. 113, 693 - 698
- WATHES, D.C., SWANN, R.W., HULL, M.G.R., DRIFE, J.O.,
PORTER, D.G. & PICKERING, B.T. (1983.b)
Gonadal sources of the posterior pituitary hormones
Progr. Brain Res. 60, 513 - 520
- WATHES. D.C., SWANN, R.W. & PICKERING, B.T. (1984)
Variations in oxytocin, vasopressin and neurophysin
concentrations in the bovine ovary during the oestrous
cycle and pregnancy
J. Reprod. Fert. 71, 551 - 557
- WATKINS, W.B. (1983)
Immunohistochemical localisation of neurophysin
and oxytocin in the sheep corpora lutea
Neuropeptides 4, 51 - 54

WEBB, R., MITCHELL, M.D., FALCONER, J. &
ROBINSON, J.S. (1981)

Temporal relationship between peripheral plasma concentrations of oxytocin, progesterone and 13,14-dihydro-prostaglandin $F_{2\alpha}$ during the oestrous cycle and early pregnancy in the ewe

Prostaglandins 3, 443 - 453

WEISS, T.J., ARMSTRONG, D.T., McINTOSH, J.E.A. &
SEAMARK, R.F. (1978)

Maturational changes in sheep ovarian follicles; Gonadotropin stimulation of cAMP-production by isolated theca and granulosa cells

Acta endocr., Copenh. 89, 166 - 172

WESTON, P.G. & HIXON, J.E. (1980)

Effect of in vivo $PGF_{2\alpha}$ administration on in vitro progesterone-synthesis by bovine corpora lutea

Biol. Reprod. 22, 259 - 269

WILLIAMS, M.T. & MARSH, J.M. (1978)

Oestradiol-inhibition of LH-stimulated progesterone-synthesis in isolated bovine luteal cells

Endocrinol. 103, 1611 - 1618

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Heinrich Karg möchte ich meinen Dank für die Überlassung des Themas, sowie die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten am Institut aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Dieter Schams danke ich für die jederzeit gewährte Unterstützung sowie für die Geduld und die Ratschläge bei der Erstellung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. W. Leidl, insbesondere bei seiner Mitarbeiterin Frau Dr. Angelika Stock möchte ich mich für die wertvollen Hinweise für die Durchführung der Zellversuche bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. T.A.M. Kruip für die Einführung in die Arbeit mit Follikeln und die gemeinsam durchgeführten Versuche.

Herrn Dr. H.H.D. Meyer sowie seinen Mitarbeitern bin ich für die Hilfestellung bei der Durchführung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie sowie der Prostaglandinanalysen zu Dank verpflichtet.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts, vor allem bei Elisabeth, Inge und Kurt und nicht zuletzt bei Herrn Oberpriller.

Für die große Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit bedanke ich mich bei Herrn Fritz Dirschedl.

LEBENS LAUF

Koll Robert geb. 27.01.1956 in Prienbach/Inn als
erster Sohn des Ehepaares Franz Koll
und seiner Ehefrau Elisabeth, geb.
Hobelsberger

Schulbildung 1962 - 1966 Volksschule in Prienbach
1966 - 1976 Tassilo-Gymnasium in
Simbach/Inn
Reifeprüfung am 25.06.76

Wehrdienst 1976 - 1977 in Cham (Oberpfalz) und
Pocking (Niederbayern)

Universitätsstudium 1977 - 1982 10 Semester Tiermedizin
an der Ludwig-Maximilians Universität
in München

Staatsexamen 11.11.82

Approbation 17.01.83

Heirat 16.08.83 Ehefrau Dr. Ingrid Nawrath-
Koll, geb. Nawrath

Seit 15.11.1982 arbeite ich am Institut für Physiologie der
Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirt-
schaft in Weihenstephan. Seit 01.01.1983 bin ich als wissen-
schaftliche Hilfskraft angestellt. Während dieser Zeit wurde
die vorliegende Arbeit angefertigt.

